



## UTILITAT DE LA TONOMETRIA ARTERIAL PERIFÈRICA PER A L'AVUACIÓ DEL RISC CARDIOVASCULAR.

Raimon Ferré Vallès

Dipòsit Legal: T 48-2015

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

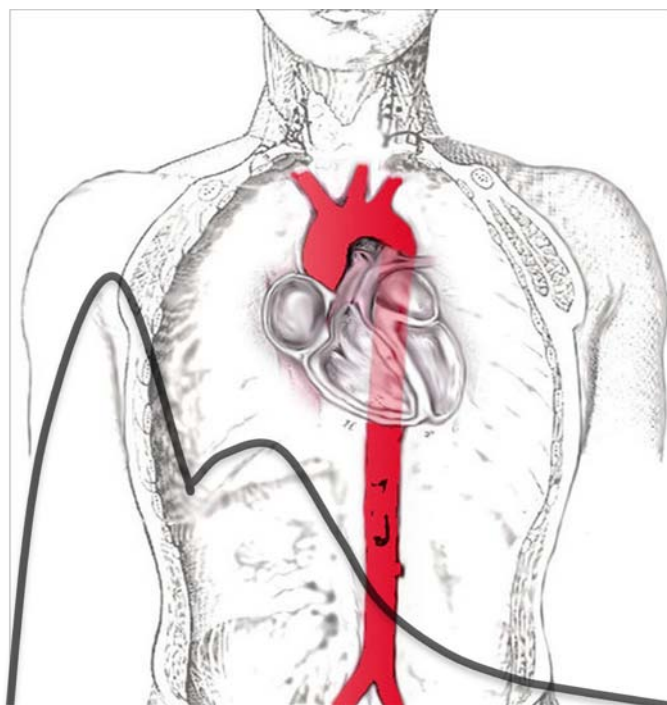
**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Utilitat de la tonometria arterial perifèrica  
per a l'avaluació del risc cardiovascular**



**Raimon Ferré i Vallès**

**TESI DOCTORAL**

**2011**

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**



**Utilitat de la tonometria arterial perifèrica  
per a l'avaluació del risc cardiovascular**

**Raimon Ferré i Vallès**

**TESI DOCTORAL**







**Autor: Raimon Ferré i Vallès**

**Títol de la tesi: Utilitat de la tonometria arterial  
perifèrica per a l'avaluació del risc cardiovascular**

**Tesi doctoral dirigida pel Prof. Lluís Masana Marín**

**Facultat de Medicina i Ciències de la Salut.  
Departament de Medicina i Cirurgia. Unitat de Recerca  
de Lípids i Arteriosclerosi.**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Reus**

**2011**







**Autorització del director/a o codirector/s/a/es de la tesi doctoral**

DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL	
Títol de la tesi doctoral <b>UTILITAT DE LA TONOMETRIA ARTERIAL PERIFÈRICA PER A L'AVALUACIÓ DEL RISC CARDIOVASCULAR</b>	
Doctorand <b>RAIMON FERRÉ I VALLÈS</b>	
Programa de Doctorat / Programa Oficial de Postgrau <b>MÈTODES DE RECERCA EN CIÈNCIES CLÍNiques</b>	
Departament <b>MEDICINA I CIRURGIA</b>	Grup de recerca <b>UNITAT DE RECERCA DE LÍPIDS I ARTERIOSCLEROSI</b>
Director <b>PROF. LLUÍS MASANA MARÍN</b>	Correu electrònic del Director <a href="mailto:luís.masana@urv.cat">luís.masana@urv.cat</a>

INFORME DEL DIRECTOR DE TESI		
El/s (co)director/s sotasignats emeten l'informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit, en base a la revisió dels següents elements de qualitat:		
	SI	NO
La tesi consisteix en un treball original de recerca	X	
El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi	X	
Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats	X	
La metodologia està descrita	X	
Hi consta el procediment	X	
Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos	X	
Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats	X	
La bibliografia està ben reflectida	X	
D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques:		
<p>High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1 levels strongly influence the reactivity of small peripheral arteries.                      Ferré R, Aragonès G, Plana N, Merino J, Heras M, Buixadera C, Masana L. Atherosclerosis. 2011 May;216(1):115-9.</p> <p>Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity.                      Ferré R, Plana N, Merino J, Aragonès G, Girona J, Heras M, Coll B, Cos R, Masana L. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2010 Aug 11.</p> <p>Small artery dilation and endothelial markers in cardiovascular risk patients.                      Aragonès G, Ferré R, Girona J, Plana N, Merino J, Heras M, Masana L. Eur J Clin Invest. 2011 Jun 1. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02553.x.</p> <p>Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes.                      Aragonès G, Ferré R, Lázaro I, Cabré A, Plana N, Merino J, Heras M, Girona J, Masana L. Atherosclerosis. 2010 Nov;213(1):329-31.</p> <p>Heterozygous familial hypercholesterolaemic patients have increased arterial stiffness, as determined with the augmentation index.                      N Plana, R Ferré, J Merino, G Aragonés, Girona J, Heras M, LI Masana. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2011. En revisió.</p> <p>La rigidesa arterial mesurada per l'índex d'augment és un determinant del gruix íntima-mitja carotídi en pacients amb risc cardiovascular moderat. Ferré R, Aragonès G, Plana N, Merino J, Heras M, Buixadera C, Masana L.</p>		

I en conclusió, s'emet l'informe FAVORABLE pel tràmit de dipòsit de la tesi doctoral i posterior defensa pública.

Reus, 21 de juny de 2011

Lluís Masana Marín

Director de la tesi



# Utilitat de la tonometria arterial perifèrica per a l'avaluació del risc cardiovascular

---

## Agraïments

A tota la meva família.

A tots els voluntaris, que de forma desinteressada han fet possible els treballs que componen aquesta tesi doctoral.

A les persones de la Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, a les de la Unitat de Medicina Vasculard i Metabolisme i a les del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Sant Joan que m'han ajudat a dur a terme aquest treball.

Al director de la tesi, el Prof. Lluís Masana, de qui aprenc inclús dels seus silencis.

Al Dr. Antoni Castro, per tota la medicina que m'ha ensenyat.

Als meus amics, amb qui sempre m'agradaria estar més temps.













1. ÍNDEX D'ABREVIATURES.....	19
2. PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ.....	23
3. INTRODUCCIÓ.....	29
3.1 Arteriosclerosi, els factors de risc cardiovascular i la malaltia cardiovascular.....	31
3.2 Càlcul del risc cardiovascular global.....	33
3.3 Estudis d'arteriosclerosi subclínica.....	38
3.3.1. Estudis d'imatge.....	38
3.3.1.1. Detecció del gruix íntima-mitja carotí per ecografia.....	38
3.3.1.2. Altres tècniques.....	41
3.3.2. Estudis funcionals: la tonometria arterial perifèrica.....	43
3.3.2.1. El mètode EndoPAT-2000.....	45
3.3.2.1. Funció endotel·lial.....	48
3.3.2.2. Rigidesa arterial.....	51
3.4. Marcadors biològics i endoteli.....	58
3.4.1. Molècules d'adhesió endotelials.....	58
3.4.2. Oxidació lipídica.....	60
3.4.3. Molècules mediadores d'inflamació.....	61
3.4.4. La <i>adipocyte fatty acid binding protein</i> (FABP4).....	62
3.5. Canvis terapèutics de l'estil de vida.....	63

4. HIPÒTESI.....	69
5. OBJECTIUS.....	75
6. MATERIALS I MÈTODES.....	77
6.1. Població estudiada.....	79
6.2. Aspectes ètics.....	80
6.3. Mostres obtingudes. Anàlisi bioquímica.....	80
6.4. Estudis morfològic i funcional vascular.....	81
6.5. Anàlisi de citoquines: <i>Human cytokine antibody array</i> .....	85
6.6. Anàlisi de les partícules LDL oxidades i anticossos de les LDLoxidades.....	86
6.7. Estudi de la FABP4 circulant per la tècnica d'ELISA.....	87
6.8. Anàlisi estadística.....	89
7. ESTUDIS.....	91
7.1. Estudi A: <i>High-density lipoprotein cholesterol and     apolipoprotein A1 levels strongly influence the reactivity of small     peripheral arteries</i> .....	97
7.2. Estudi B: La rigidesa arterial mesurada per l'índex d'augment és un determinant del gruix íntima-mitja carotidi en pacients amb risc cardiovascular moderat.....	105
7.3. Estudi C: <i>Heterozygous familial hypercholesterolaemic     patients have increased arterial stiffness, as determined with the     augmentation index</i> .....	115
7.4. Estudi D: <i>Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral     artery tonometry in patients with abdominal     obesity</i> .....	129
7.5. Estudi E: <i>Small artery dilation and endothelial markers in     cardiovascular risk patients</i> .....	143

7.6. Estudi F: *Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes*.....153

8. DISCUSSIÓ GENERAL.....159

9. CONCLUSIONS.....169

10. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.....173

11. ANNEX. Fulla d'informació al participant i consentiment informat.....201



<b>ABI</b>	Ankle-brachial index
<b>Alx</b>	Índex d'augment
<b>Alx@75</b>	Índex d'augment ajustat a 75 bpm
<b>CEV</b>	Canvis d'estil de vida
<b>CKD</b>	Chronic kidney disease
<b>CVD</b>	Cardiovascular disease
<b>cIMT</b>	Carotid intima-media thickness
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>CV</b>	Cardiovascular
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>ITB</b>	Índex turmell-braç
<b>DM2</b>	Diabetis mellitus tipus 2
<b>eNOS</b>	Sintasa d'òxid nítric
<b>FH</b>	Familial Hypercholesterolemia
<b>FMD</b>	Flow-mediated dilation
<b>FRCV</b>	Factors de risc cardiovascular
<b>FRS</b>	Framingham Risk Score
<b>GIM</b>	Gruix íntima-mitja
<b>GIMc</b>	Gruix íntima-mitja carotidi
<b>HDL</b>	High-density lipoprotein
<b>HF</b>	Hipercolesterolèmia familiar
<b>HT</b>	Hypertension
<b>HTA</b>	Hipertensió arterial
<b>IMT</b>	Intima-media thickness
<b>IRC</b>	Insuficiència renal crònica

<b>LDL</b>	Low-density lipoprotein
<b>LDLox</b>	Lipoproteïnes LDL oxidades
<b>MCV</b>	Malaltia cardiovascular
<b>MS</b>	Metabolic syndrome
<b>ON</b>	Òxid nítric
<b>PAT</b>	Tonometria arterial perifèrica
<b>PCR</b>	Proteïna C reactiva
<b>PCRus</b>	Proteïna C reactiva ultra sensible
<b>PWA</b>	Pulse wave amplitude
<b>PWV</b>	Pulse wave velocity
<b>RHI</b>	Reactive hyperemia index
<b>SM</b>	Síndrome metabòlica
<b>T2DM</b>	Type-2 diabetes mellitus
<b>TC</b>	Total cholesterol
<b>Tg</b>	Triglicerydes/Triglicèrids
<b>TLSC</b>	Therapeutic lifestyle changes
<b>TNF</b>	Factor de necrosi tumoral
<b>VOP</b>	Velocitat d'ona de pols







## 2. Presentació i justificació



El projecte de tesi doctoral que es presenta ha estat realitzat a la Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili amb la col·laboració de la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus. Ha estat dirigida pel Prof. Lluís Masana.

La Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi fa ja 25 anys que contribueix a la investigació de les causes i mecanismes que afavoreixen la formació de la placa d'ateroma, causant majoritària de la malaltia cardiovascular. La Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme és una unitat clínica especialitzada, amb un estret vincle a l'anterior, que pretén tenir cura d'aquells pacients amb risc cardiovascular incrementat i alhora investigar també en l'àmbit clínic d'aquests factors de risc.

Els trastorns lipídics, la hipertensió arterial, la síndrome metabòlica, la diabetis mellitus tipus 2, la obesitat abdominal i el tabaquisme són els principals factors de risc cardiovascular. Tots, excepte el tabaquisme, són any rere any més prevalents, essent ja en l'actualitat els responsables de la primera causa de mortalitat en els països desenvolupats i també en aquells en vies de desenvolupament. El càlcul de la probabilitat de patir una malaltia cardiovascular a 10 anys s'obté mitjançant un càlcul de risc en unes taules extretes d'estudis poblacionals prospectius. Les variables determinants d'aquest risc segons les taules són l'edat, el sexe masculí o femení, la pressió arterial, el colesterol total o colesterol LDL, els triglicèrids, el colesterol HDL, el tabaquisme i l'existència o no de diabetis mellitus tipus 2. Aquests càlculs però, prediuen el risc a 10 anys pel que no es disposa encara d'estimacions ni a més curt ni a més llarg termini i, per altra banda, en l'actualitat, els factors de risc cardiovasculars es detecten i es tracten abans pel que també són necessàries

eines de detecció de la lesió vascular i cardíaca subclínica amb més capacitat per detectar aquesta lesió més precoç.

Des d'un punt de vista científic, els treballs exposats aporten noves dades sobre la utilitat clínica de la tonometria arterial perifèrica. Aquesta tècnica permet l'estudi de la rigidesa arterial central, a través de l'anàlisi de la ona de pols, i de la reactivitat de les artèries de petita mida, les causants de la resistència perifèrica. Els estudis presentats demostren com la reactivitat hiperèmica de petites artèries s'associa amb els factors de risc cardiovascular clàssics, en concret amb els nivells de colesterol HDL i triglicèrids, el tabaquisme i amb dades antropomètriques com el perímetre abdominal. A més, es mostra com els canvis terapèutics de l'estil de vida milloren la capacitat de vasodilatació arterial en pacients amb obesitat abdominal i que aquest fet s'acompanya d'una menor progressió en el gruix íntima-mitja carotí respecte als individus que no assoleixen la millora en la reactivitat arterial. La rigidesa arterial central mesurada per l'índex d'augment s'associa directament amb el gruix íntima-mitja carotí en individus amb risc cardiovascular moderat i n'és un dels principals determinants, podent ser útil en la estratificació del risc en aquest grup de pacients. En la hipercolesterolèmia familiar, l'índex d'augment està directament relacionat amb la apolipoproteïna B100 i és també un determinant del gruix íntima-mitja carotí malgrat el bon control lipídic, pel que podria ser un nou marcador de risc en aquesta malaltia hereditària. Finalment, s'han estudiat marcadors a sèrum de la funció endotel·lial, els nivells elevats de la selectina-E, la VCAM i la relació LDL oxidada/LDL total s'associen a una menor reactivitat de les artèries de petita mida.

Aquestes troballes no han estat descrites prèviament, per tan la tesi doctoral aporta nous coneixements que ajuden a entendre millor el funcionament de les artèries causants de la resistència perifèrica, com aquest funcionament es veu afectat pels factors de risc cardiovascular, com es relaciona també amb la lesió

ateromatosa a artèries de mida més gran i com s'associa a biomarcadors de funció endotel·lial.

La tesi està dividida en diferents seccions. La Introducció proporciona els coneixements necessaris per poder entendre el curs del treball. A continuació, la Hipòtesi i els Objectius justifiquen el desenvolupament dels estudis clínics i de laboratori. Tot seguit, els Materials i els Mètodes utilitzats per dur a terme tots els diferents estudis. Els resultats es presenten per cada estudi, juntament amb les taules i figures respectives. Després, la Discussió i les Conclusions finals de la tesi. Finalment, les Referències de tota la bibliografia consultada.



## 3. Introducció





---

### **3.1. ARTERIOSCLEROSI, ELS FACTORS DE RISC I LA MALALTIA CARDIOVASCULAR**

L'arteriosclerosi és un procés progressiu que afecta la paret de les artèries provocant-ne la pèrdua d'elasticitat i disminució de la llum arterial [1]. Afecta tant a grans com petites artèries i les seves causes són multi factorials, resultat de la interacció de la genètica i l'ambient. La base patogènica és inflamatòria, provocant el dipòsit a l'espai subendotelial de material lipídic, proliferació de cèl·lules musculars llises, material fibròtic i cèl·lules inflamatòries [2].

Aquest procés és la principal causa de malaltia cardiovascular [3]. L'evolució de la lesió arterioscleròtica pot ser lenta provocant una disminució progressiva de la llum del vas o bé sobtada, degut a la ruptura de l'endoteli i exposició a la llum del vas del material ateromatós que condiciona un fenomen trombòtic. Aquesta última possibilitat és la causant de la malaltia cardiovascular aguda com per exemple l'ictus o la síndrome coronària aguda [2]. La ruptura d'una placa vulnerable provocarà trombosi de la llum del vas i l'esdeveniment clínic agut. En un mateix individu coexisteixen lesions ateromatoses estables i d'altres de vulnerables. Les plaques d'ateroma vulnerables estan formades per un gran dipòsit lipídic necròtic, una capa fibrosa prima, rica neovascularització i hemorràgia intraplaca, i força inflamació a l'adventícia i a la capa fibrosa. Aproximadament, el 76% de tots els trombus coronaris són originats per la ruptura d'una placa, i això és més freqüent en homes que en dones, 80% contra 60% [4]. Per tan, en la formació i evolució de la placa d'ateroma hi participen l'endoteli, els lípids i lipoproteïnes, la inflamació, la necrosi, l'angiogènesi, la cèl·lula muscular llisa i la trombosi. Aquests processos es veuran accelerats o modificats pels factors de risc cardiovascular.

La malaltia cardiovascular és la principal causa de mortalitat en els països desenvolupats i en vies de desenvolupament i es creu que serà la primera causa de mort a tot el món d'aquí a una dècada. En concret, segons el darrer informe de mortalitat global de la Organització Mundial de la Salut, la cardiopatia isquèmica, l'ictus i altres malalties vasculars cerebrals en són les

primeres causes, responsables de 10.18 milions de morts en els països en vies de desenvolupament i de 2.21 milions de morts en els països desenvolupats l'any 2008 [5]. A Espanya, 125.000 morts anuals es deuen a l'aterosclerosi, 5 milions de persones ingressen a l'hospital a causa de la malaltia i més de 560.000 pacients són donats d'alta de l'hospital amb el diagnòstic de patir malaltia cardiovascular [6].

Els factors de risc clàssics, especialment la HTA, la hipercolesterolèmia, la diabetis mellitus, la síndrome metabòlica i el tabaquisme, són predictors útils de morbiditat i mortalitat cardiovascular i el seu control es tradueix en una reducció dels esdeveniments clínics [3].

La evolució des de l'exposició a un factor de risc fins la presentació d'un esdeveniment clínic va precedida per una fase de lesió estructural i funcional asimptomàtica, la lesió subclínica o arteriosclerosi subclínica, això comporta que es pugui identificar aquell pacient amb més alt risc estudiant l'afectació dels òrgans diana d'aquests factors de risc.

La capacitat de preveure les complicacions cardiovasculars mitjançant la detecció i control dels factors de risc clàssics és limitada, restant el que s'anomena risc residual. És per aquest motiu que se segueixen investigant nous factors de risc cardiovascular i valorant el seu paper independent de patir un malaltia cardiovascular, així com altres aspectes importants, com són la variabilitat inter i intra individual, la dificultat de la tècnica, el cost, la reproduïbilitat, que facin possible la seva utilitat a la pràctica clínica.

Els factors de risc poden ser no modificables, entre aquests la edat, el sexe i la història familiar de malaltia cardiovascular precoç. Entre els modificables hi ha el tabaquisme, la dislipèmia, la hipertensió arterial, la diabetis mellitus i la prediabetis i la obesitat abdominal.

En els darrers anys s'han descrit a més, altres factors anomenats emergents, entre els que hi consten paràmetres analítics com la proteïna C reactiva ultra sensible, la microalbuminúria i la relació microalbúmina/creatinina en orina, el filtrat glomerular i d'altres que demostren lesió estructural o funcional asimptomàtica com són la hipertròfia ventricular esquerra, la disfunció

endotel·lial, el GIMc incrementat, la VOP augmentada i l'índex turmell-braç patològic [7].

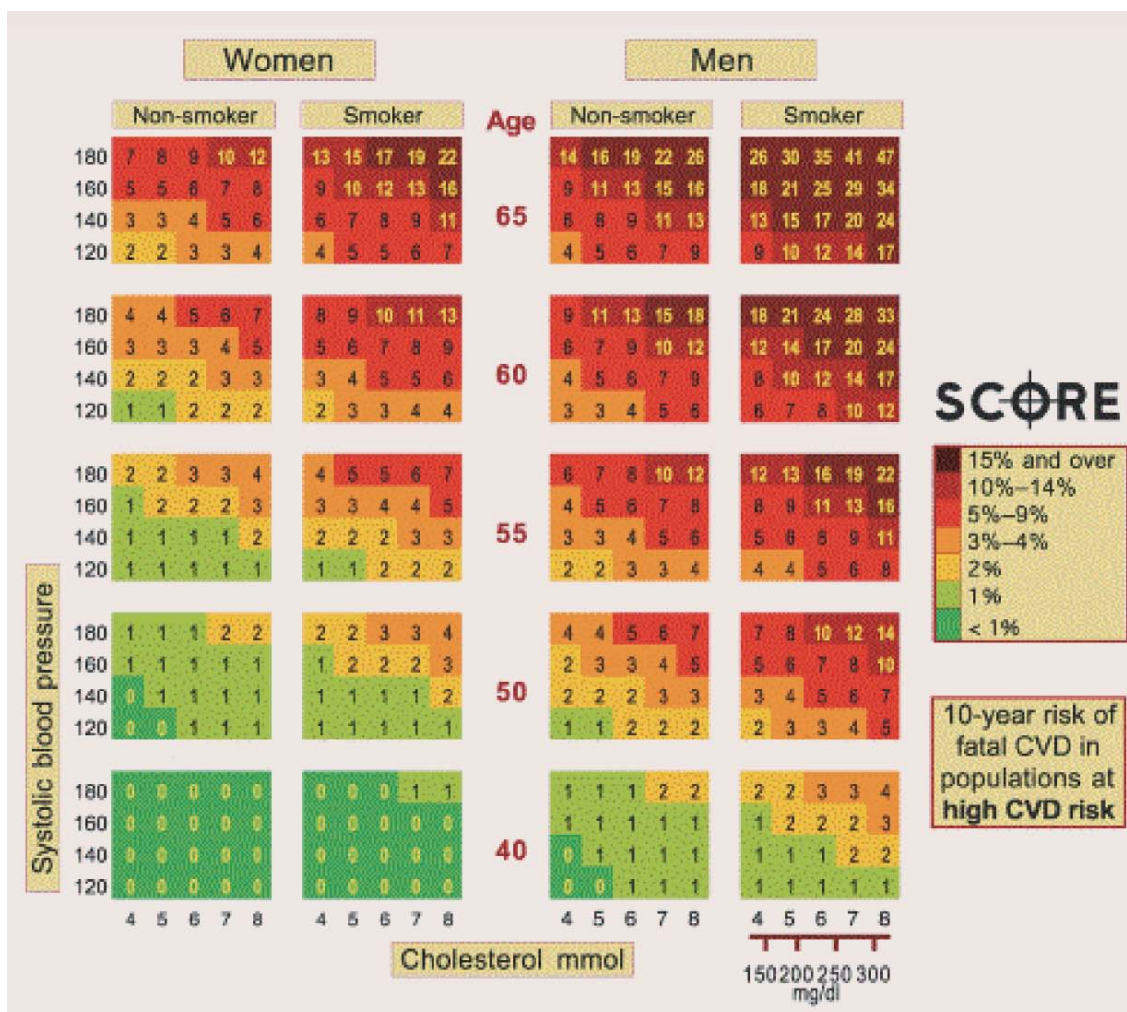
### 3.2. CÀLCUL DEL RISC CARDIOVASCULAR GLOBAL

Molt sovint, aquells pacients que presenten un factor de risc cardiovascular en tenen altres. En el nostre país, el 53% dels hipertensos tenen també algun tipus de dislipèmia, el 24% són fumadors, el 40% diabètics i el 54% presenten obesitat abdominal [8].

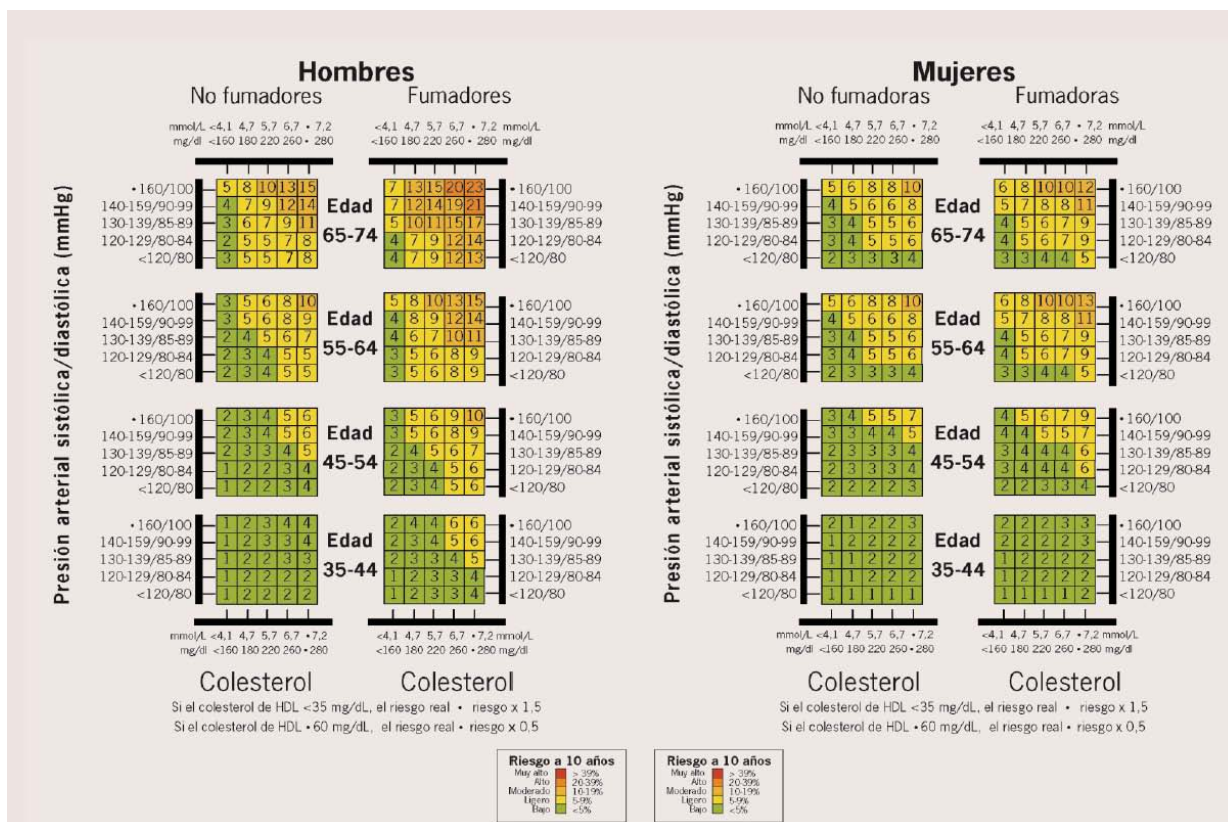
El fet de patir més d'un factor de risc ara confereix no el doble de risc de tenir-ne un sol sinó que quasi bé l'augmenta de forma exponencial, així un individu amb HTA i amb tabaquisme, DM2 i dislipèmia té 20 vegades més risc que aquell que només presenta HTA [9].

És per aquest motiu que el risc cardiovascular s'avalua de forma global, tenint en compte els diversos factors de risc i la seva interacció. Gràcies a grans estudis epidemiològics s'han dissenyat taules d'estimació de risc cardiovascular ja sigui en morbiditat o mortalitat cardiovascular als 10 anys. Aquesta és la eina més útil, ràpida, fiable, reproduïble, de les que disposem en l'actualitat per aconseguir una aproximació del risc cardiovascular d'un pacient. Entre les taules més utilitzades hi ha les taules de Framingham, estudi realitzat a Estats Units a la població de Framingham a aproximadament 100.000 habitants de 35 a 74 anys d'edat, amb un seguiment de 40 anys i en base a la incidència de malaltia coronària [10], l'SCORE, un model europeu que disposa de dues taules, una per països amb baix risc, els de l'àrea mediterrània i una altra per països d'alt risc, nòrdics, vàlida fins als 65 anys d'edat i amb predicció de mort cardiovascular [11] i una de pròpia per la nostra població, la taula REGICOR, taula que adapta les condicions de la de Framingham a la població mediterrània, realitzat a Girona amb 25 anys de seguiment, calcula la probabilitat de malaltia coronària als 10 anys i es pot utilitzar fins als 74 anys [12].

Altres sistemes de càlcul del risc CV menys utilitzats són l'ASSIGN (*CV risk estimation model from the Scottish Intercollegiate Guidelines Network*), el Q-Risk, el PROCAM (*Prospective Cardiovascular Munster Study*) i el WHO (*World Health Organization*). [13, 14]



**Figura 1.** Taula d'estratificació del risc de mortalitat cardiovascular a 10 anys per a població d'alt risc segons el mètode SCORE.



**Figura 2.** Taula d'estratificació del risc cardiovascular segons el mètode REGICOR.

Tot i les avantatges que ofereixen aquests sistemes de predicció del risc cardiovascular global per la seva facilitat i rapidesa d'ús presenten també alguns inconvenients [13,14]:

- La predicció és a 10 anys, per tan no ofereixen càlcul ni a més llarg termini o curt termini.
- Només són aplicables en l'edat adulta, no essent vàlides ni en l' infància ni a la vellesa.
- La taula de Framingham està basada en una població americana, amb risc coronari més alt que la nostra, motiu pel qual la fa difícil d'aplicar a la població mediterrània ja que podria sobreestimar el risc cardiovascular.

- Són útils en estudis poblacionals però la seva aplicació individual és discutible.
- No incorporen en la seva edició original, factors de risc cardiovascular tan acceptats com el colesterol HDL, trigliceridèmia, història familiar de cardiopatia isquèmica precoç o altres dades analítiques.
- Només són aplicables en prevenció primària de la malaltia cardiovascular.

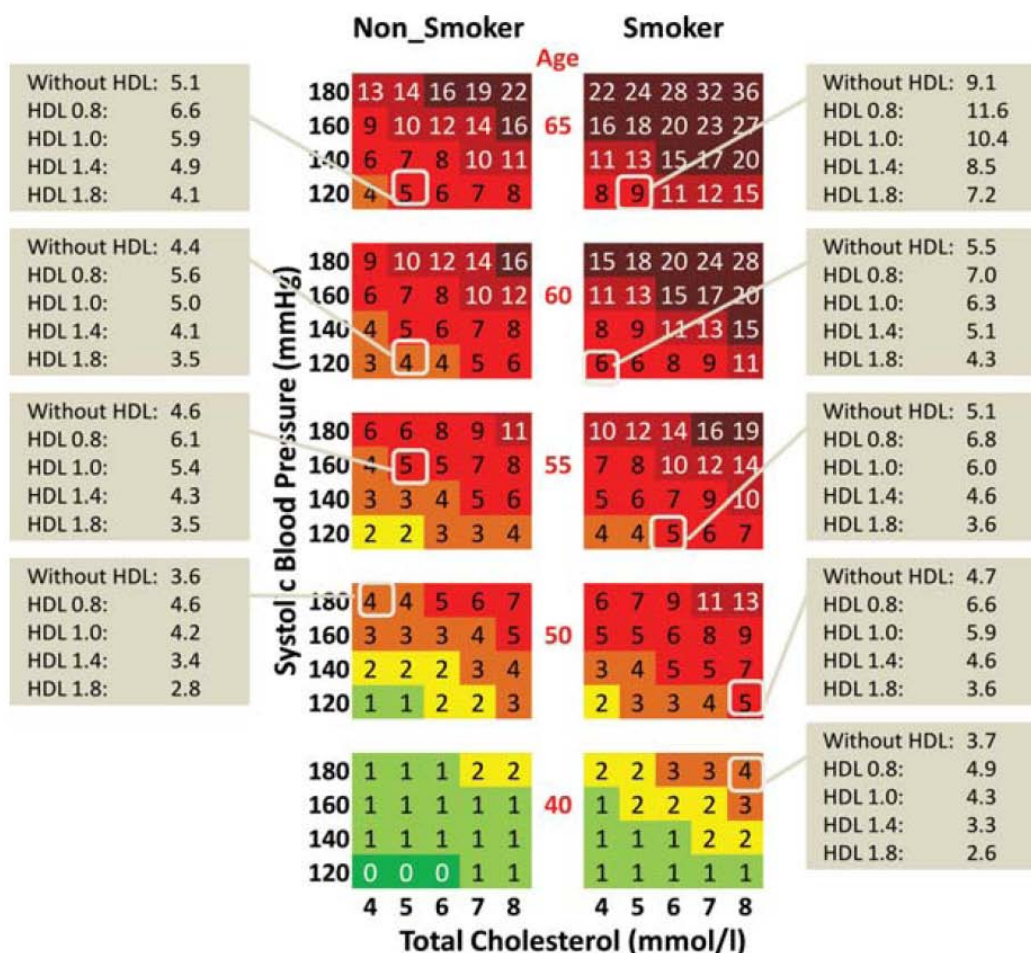
Per totes aquestes raons, aquestes taules han estat modificades incloent altres factors de risc com el colesterol HDL, el colesterol no-HDL, els triglicèrids i inclús els anomenats factors de risc emergents, com la incorporació de la PCRus, marcadors de lesió miocardiàca, la fosfolipasa A2, el GIMc i la VOP [15-19].

Aquestes adaptacions amb la incorporació de noves variables a les taules ha incrementat, en algun cas, la capacitat predictiva encara que la relació cost-benefici de paràmetres de laboratori que no són de determinació habitual o proves complementàries que no estan a l'abast de tots els centres sanitaris, no sembla estar justificada si s'han d'aplicar a tota la població.

No obstant, la determinació del colesterol HDL sí que és un paràmetre de laboratori de rutina i, els nivells de colesterol HDL són un factor que predisposa a l'aterosclerosi quan són baixos. Quan a les taules d'estratificació de risc d'SCORE s'ha incorporat el colesterol HDL com a variable, la predicció del risc ha estat més precís. Aquest nou sistema ha estat incorporat a la guia pel maneig de la dislipèmia de les societats europees d'aterosclerosi i cardiologia (EAS i ESC, respectivament) publicat recentment, que incorporen un factor de correcció al càlcul del risc segons els nivells de colesterol HDL.

L'efecte del colesterol HDL és present a qualsevol nivell de risc, tan en dones com en homes i a qualsevol edat, i aquest efecte és d'especial importància en els individus amb baix risc (<5%), que en presència de colesterol HDL baix es redistribuirien a un risc superior. La versió electrònica d'aquest sistema de càlcul del risc cardiovascular es pot consultar a: [www.heartscore.org](http://www.heartscore.org). [20].

Figura 3.



**Figura 3.** Exemple de la modificació del risc segons les taules d'SCORE en incorporar els nivells de colesterol HDL. Taula corresponent a la població d'alt risc.

La proporció més alta d'esdeveniments cardiovasculars apareix a la població amb risc cardiovascular moderat, és per això que l'ús d'eines de cribatge d'arteriosclerosi subclínica i d'estratificació del risc més enllà de les taules de risc en aquest subgrup pot estar justificat.

### **3.3. ESTUDIS D'ARTERIOSCLEROSI SUBCLÍNICA.**

#### **3.3.1. Estudis d'imatge.**

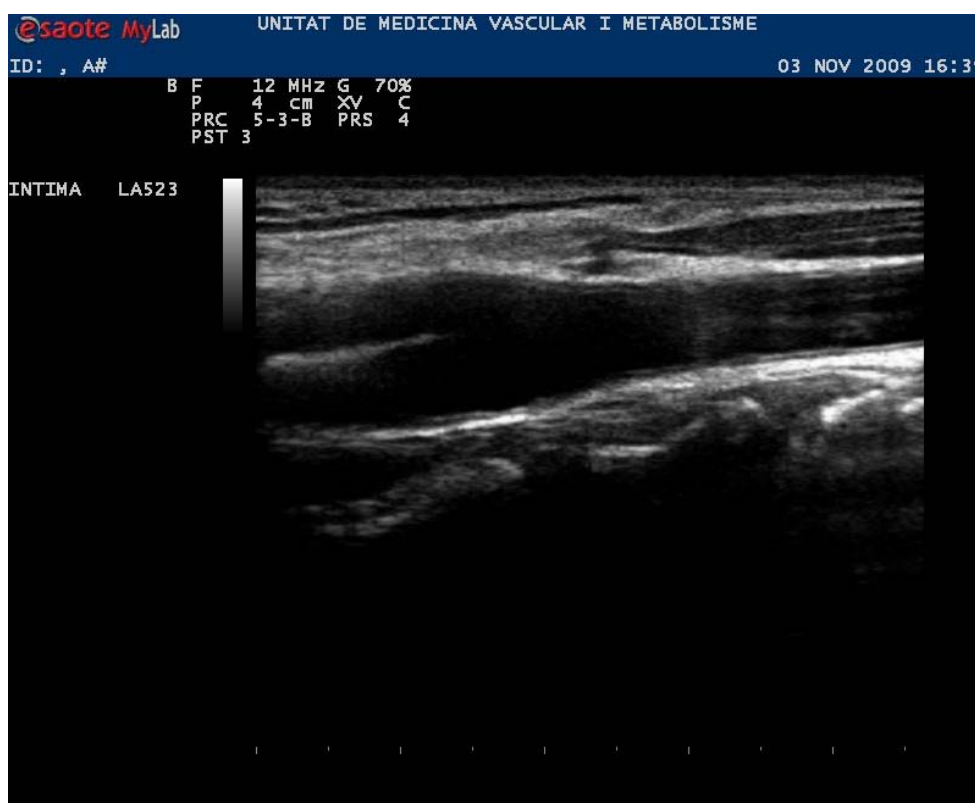
##### **3.3.1.1. Detecció del gruix íntima-mitja carotídi per ecografia**

La detecció del GIMc per ecografia és probablement el millor mètode per avaluar la presència d'arteriosclerosi subclínica a nivell de lesió arterial. És un mètode reproducible i relativament fàcil d'utilitzar el qual consisteix en realitzar una ecografia de les artèries caròtides per mesurar els canvis estructurals que es produeixen a la paret dels vasos sanguinis a causa de l'arteriosclerosi. Es basa en la determinació de la distància entre la interfase llum-endoteli vascular i mitja-adventícia. La metodologia està descrita en consens tan europeu com americà [21, 22] i es descriu a la secció de Mètodes. A la pràctica clínica té un nivell d'evidència IIa i està recomanat com eina de cribatge d'arteriosclerosi subclínica a aquells individus amb risc CV moderat [23].

El GIMc augmenta amb el nombre de factors de risc CV associats amb l'edat, el gènere, el tabaquisme, la hipertensió, la hipercolesterolèmia i la DM2, entre altres [24]. És un mètode no invasiu i reproducible per a la detecció d'arteriosclerosi subclínica. A més, és una tècnica relativament barata i segura que pot visualitzar la llum i les parets de les artèries seleccionades. Hi ha molts estudis que mostren que el GIMc està directament relacionada amb el risc CV [25].



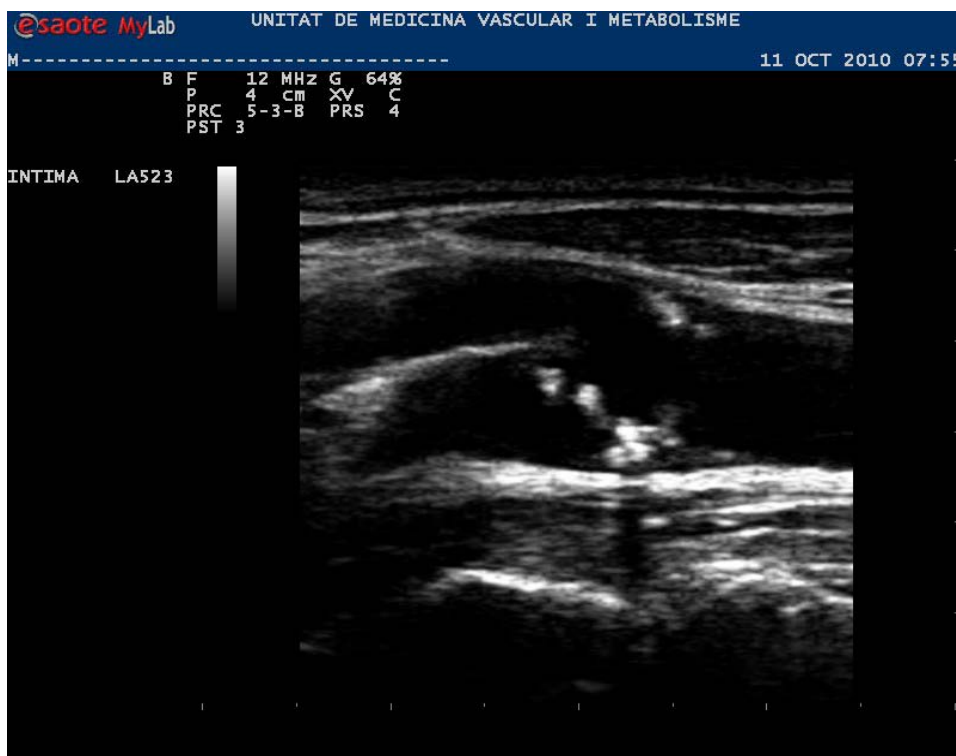
El GIMc es considera un indicador de l'edat arterial, i alguns estudis han demostrat que l'addició d'aquesta variable a l'equació de Framingham millora la predicció del risc [25]. És ben conegut que la progressió del GIMc s'associa a una major probabilitat d'esdeveniments cardiovasculars, l'increment de 0.1mm comporta un increment del 12% de risc per a patir una síndrome coronària aguda o un ictus [26].



**Figura 4.** Imatge ecogràfica de l'artèria caròtida en que es pot apreciar les tres regions: caròtida comú, bifurcació i caròtida interna i el gruix íntima-mitja en la seva paret distal.

A més, també s'ha descrit que la progressió de més de  $> 0.03\text{mm/any}$  triplica la probabilitat de presentar un esdeveniment cardiovascular [26]. La progressió del GIMc pot ser aturada i fins i tot invertida per alguns dels tractaments pels factors de risc cardiovascular, com les estatines, l'àcid nicotínic i alguns

hipotensors, especialment els inhibidors del sistema renina-angiotensina [27,28]. Tan és així que la regressió o la no progressió del GIMc ha estat un dels objectius d'alguns estudis de fàrmacs pel tractament dels factors de risc cardiovascular, més enllà de l'efecte farmacològic principal [29-31].



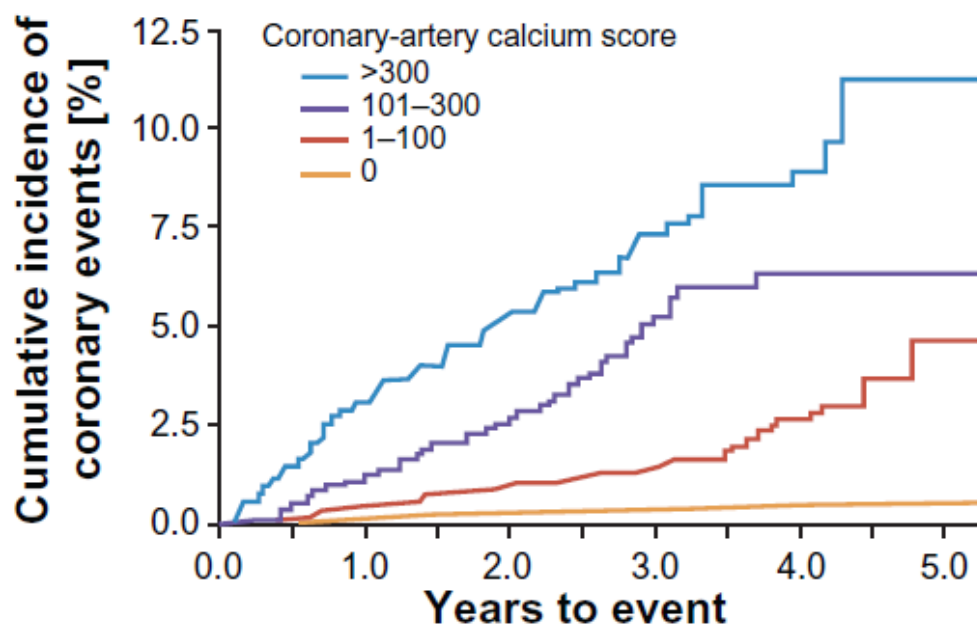
**Figura 5.** Exemple ecogràfic de plaques d'ateroma calcificades a paret proximal i distal del bulb carotí i inici de caròtida interna.

Molts autors afirmen que la mesura del GIM hauria de ser realitzada en tots els individus amb risc cardiovascular moderat per tal de poder triar una millor intervenció clínica [32]. I així ho demostren els darrers metanàlisi publicats, és precisament en aquest subgrup de pacients on la determinació del GIMc tindrà més valor per a la estratificació del risc i per si es considera, efectuar canvis terapèutics. Aquests estudis demostren que la menor progressió del GIMc s'associa a una menor probabilitat de patir malaltia coronària.

L'existència de placa d'ateroma també es pot visualitzar per ecografia carotídia i els estudis demostren que és també un factor independent de risc cardiovascular. De fet, l'existència de placa afegida a la determinació del GIMc té una capacitat predictiva encara major per la malaltia coronària [33,34,22].

### 3.3.1.2. Altres tècniques.

Altres mètodes no invasors per detecció d'aterosclerosi subclínica són l'*score* càlcic coronari i la ressonància magnètica. La determinació de calci coronari és una tècnica reproducible, no invasora, però causa irradiació. L'existència de calci coronari és patognomònic d'aterosclerosi i el grau de calcificació es relaciona directament amb mortalitat coronària [35]. Un dels primers estudis que relacionà l'*score* càlcic coronari amb el risc CV fou publicat l'any 2000 en 1172 individus i 3.6 anys de seguiment, l'*score* càlcic es determinà per tomografia axial computeritzada i s'associà a l' incidència de infart de miocardi, mortalitat coronària i necessitat de re vascularització [36]. En un estudi realitzat per Greenland et al [37], l'*score* càlcic fou un predictor de malaltia coronària independent del càlcul aconseguit per les taules de risc de Framingham. I en un altre gran estudi amb 11.000 participants i 3.5 anys de seguiment s'observà que la incidència de malaltia coronària era més alta quan l'*score* càlcic era superior a 400 [38]. El Prospective Army Coronary Calcium Project (PACC) mostrà que la presència de calci coronari augmenta el risc 11.8 vegades de malaltia coronària en una població entre 40 i 50 anys [39]. L'estudi *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis* (MESA) va observar l'*score* càlcic i la malaltia coronària en diferents grups d'edat i ètnia, elaborant una calculadora que estratifica el risc segons aquestes variables i el valor de l'*score* càlcic i el gènere. Figura 6. [40].



**Figura 6.** Corba de Kaplan Meier d'esdeveniments coronaris cumulatiu segons score càlcic coronari. Totes les diferències entre corbes són significatives. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, et al. *N Engl J Med.* 2008;358: 1336–1345.[]

La determinació de l'score càlcic, per tan, és un potent predictor del risc coronari, no obstant, la seva utilitat en base poblacional pel seu cost-efectivitat encara no és ben coneguda.

L'arteriosclerosi en pacients asimptomàtics es pot visualitzar també per ressonància magnètica nuclear (RMN), les avantatges de la RMN són la seva millor definició d'imatge, la possibilitat de la reconstrucció en 3 dimensions i l'estudi de la composició de la placa d'ateroma, aquesta última característica pot ajudar en el futur a definir quines d'aquestes plaques poden ser més vulnerables a l'ulceració i provocar la trombosi de la llum del vas. Tot i això aquesta tècnica no és aplicable a la pràctica clínica pels seu cost econòmic i de temps per efectuar-la [41].

### 3.3.2. Estudis funcionals: la tonometria arterial perifèrica.

Clàssicament, l'estudi de la funció endotel·lial i el seu paper en la reactivitat arterial basant-se en la capacitat vasodilatadora ha estat efectuat pel test intra coronari de l'acetilcolina, que consisteix en injectar acetilcolina o mesurant la vasodilatació coronària, tot i que és el mètode *gold standard*, és un sistema invasiu que no es pot aplicar universalment encara que és una mesura directa i es correlaciona els factors de risc CV [42]. Encara avui, però, el mètode més utilitzat és la mesura de la dilatació mediada per flux de l'artèria braquial (FMD). Aquest sistema es basa en la mesura ecogràfica del diàmetre de l'artèria braquial abans i després d'un isquèmia. La dilatació de 5-10 min, després de la isquèmia, és mediada per l'endoteli i depenent de NO, per tant, la FMD reflecteix la funció vasodilatadora depenent de l'endoteli [43]. La FMD es veu disminuïda en pacients amb aterosclerosi i amb factors de risc coronari i millora amb el tractament pels factors de risc CV. S'associa amb marcadors plasmàtics de funció endotelial incloent-hi els nivells de cèl·lules progenitores endotelials circulants [44]. Aquest mètode ha estat àmpliament utilitzat en assajos clínics per avaluar l'acció de fàrmacs i és capaç de preveure els esdeveniments CV [45].

No obstant, no és àmpliament utilitzat a nivell clínic per la seva alta dependència als intercanvis d'operador i la seva variabilitat inter-assaig [46]. La tonometria per aplanament és una representació reproducible, acurada i no invasiva de l'ona de pressió aòrtica [47]. L'estudi de l'ona de pressió aòrtica aporta informació més precisa que la pressió arterial a nivell de l'artèria braquial. De l'anàlisi de la curvatura, amplitud i durada de l'ona de pols es pot obtenir informació del diagnòstic i maneig de diverses malalties, incloent la HTA, la malaltia coronària, les apnees obstructives de la son, la diabetis mellitus i la disfunció ventricular sistòlica.

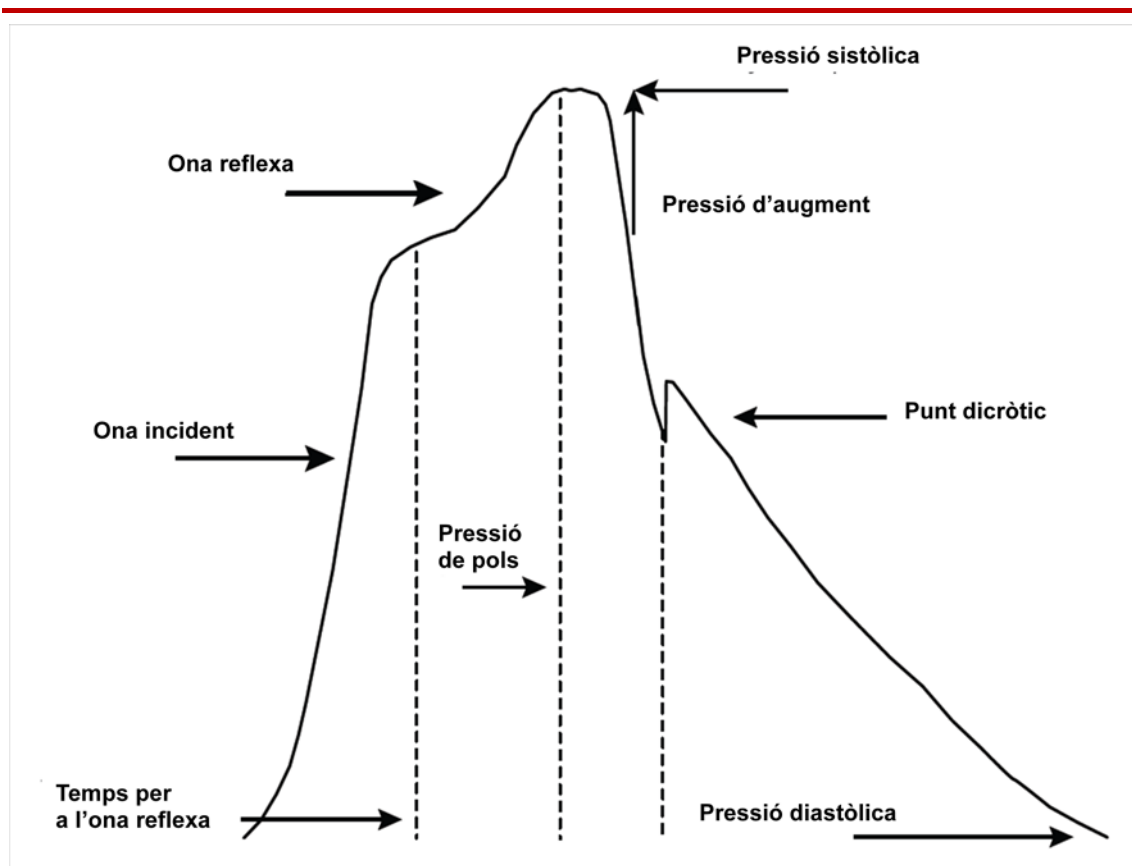
L'examen del pols arterial humà ha estat important en l'avaluació de l'estat de salut, ja els egipcis l'any 1600 aC. n'havien fet descripcions en el papir de Edwin Smith [48]. Al segle 6 aC. els xinesos practicaven l'examen del pols

arterial com una part molt important de l'exploració física d'un metge a una pacient, ja que únicament es podia fer amb la separació d'una cortina de bambú [49]. La determinació moderna de la ona de pols va ser possible gràcies a l'invenció de l'esfigmògraf per Etienne Jules Marey el 1860 [50].

La introducció del cateterisme cardíac va aportar més informació sobre la correlació entre les pressions vasculares centrals i la ona de pols perifèrica. D'aquí es va extraure el concepte d'arbre vascular responent a la ona de pressió per cada batec a una resposta d'amplitud clàssica. També s'observà que l'amplificació de la pressió sanguínia des de l'aorta a la perifèria ve donada per un increment en la pressió arterial sistòlica i que la reflexió de l'impuls cardíac a nivell dels vasos perifèrics condiona la morfologia de l'ona de pols tan central com perifèrica [51].

Però aquests primers mètodes tenien algunes limitacions com són que la morfologia de la ona de pols no és la mateixa a la perifèria que a l'aorta, i és aquesta última la que es relaciona més amb el risc cardiovascular, per altra banda l'efecte de medicacions hipotensores no és la mateixa a nivell perifèric que central i la repercussió en evitar esdeveniments cardiovasculars es pot deure a aquest motiu i finalment degut al fenomen d'amplificació, la pressió a l'artèria braquial no és la mateixa que la mesurada a l'aorta [52].

Aquestes limitacions s'han vist superades, almenys en part, amb l'aparició de la tonometria per aplanament. Aquest aplanament permet calcular les pressions arterials i per una funció de transferència a través d'un algoritme aprovat per la *Food and Drug Administration* ens proporciona els índexs de pressió central [53,54].



**Figura 7.** Representació de l'ona de pols i els seus components.

### 3.3.2.1. El mètode EndoPAT-2000.

En els darrers anys, s'han desenvolupat diversos mètodes per avaluar la funció endotelial, independents d'operador. Entre ells, la tonometria arterial perifèrica mesurada per l'aparell EndoPAT-200 sembla ser un mètode fiable [55,56,57], havent demostrat la detecció d'alteracions vasculars en pacients d'alt risc cardiovascular [58]. Aquesta tecnologia estudia l'amplitud de l'ona de pols (PWA) arterial del dit de la mà amb bio-sensors digitals, així doncs, permet l'estudi d'artèries de perifèriques de petita mida, les artèries responsables de la resistència vascular. La sonda digital consisteix en un sensor en forma de didal, que imparteix un camp de pressió uniforme i presenta un defecte semblant en tota la superfície de la falange distal valorant l'evolució del volum del pols.

Els sensors capten els canvis en el volum digital a través d'ones de pols les quals són percebudes per un transductor de pressió i analitzades directament per un software específic. Els senyals de canvi de la pressió es filtren, s'amplifiquen, i s'emmagatzemen per a la seva posterior anàlisi. Aquest aparell proporciona l'anàlisi de la morfologia de l'ona de pols i també els canvis d'aquesta posteriors a una isquèmia controlada de l'extremitat, per tan determina la rigidesa arterial central basada en l'índex d'augment i la reactivitat hiperèmica de les artèries digitals posterior a una isquèmia, el RHI, que és un marcador indirecte de la funció endotel·lial. Per realitzar les mesures, es col·loquen dues sondes, cadascuna en un dit d'ambdues mans. Després d'un període d'estabilització, una isquèmia de 5 min és induïda en el braç de prova inflant mitjançant un esfigmomanòmetre. El software específic calcula les diferències en l'amplitud de l'ona del pols abans i després de la isquèmia controlada en comparació amb el braç control. Encara que els mecanismes de control de la vasodilatació en les artèries grans i petites són probablement diferents [59], s'ha demostrat que la PWA s'associa a la producció de ON [60]. A més, aquest mètode ha estat comparat amb el *gold estàndard* de l'estudi de la funció endotel·lial, el test intra coronari amb acetilcolina, i mostra una bona sensibilitat i especificitat [55]. Quan ha estat comparat amb mètode de l'artèria braquial FMD els resultats han estat contradictoris, probablement perquè l'artèria braquial i les digitals tenen una fisiologia diferent o es comporten de manera diferent en presència de factors de risc cardiovasculars [57, 59]. Aquest mètode és capaç de detectar disfunció vascular en pacients d'elevat risc cardiovascular (Taula 1).

Recents estudis mostren correlació de PAT amb el *Framingham Risk Score* i els factors de risc cardiovascular en una població general [61,62]. La capacitat predictiva del RHI ha estat recentment demostrada i s'han associat valors disminuïts de RHI amb el risc d'hospitalització d'origen cardíac [63].



Per altra banda, un estudi recent amb una ampla població de la cohort de Framingham en el que s'ha estudiat la relació del PAT i FMD amb els factors de risc, conclou que tots dos es relacionen amb l'índex de massa corporal, però la FMD anormal es correlaciona amb l'edat i la pressió arterial sistòlica elevada mentre que el PAT anormal ho fa amb menor pressió arterial sistòlica, ràtio colesterol total/HDL elevat, diabetes, tabaquisme i teràpia hipolipemiant. És adir, que tot i ser tècniques que avaluen la resposta arterial, probablement els diferents factors de risc CV tenen efectes diferents sobre les artèries de conducció i les artèries de resistència [59].

### Estudis clínics més rellevants de la reactivitat hiperèmica amb EndoPAT-2000

Estudi	Població	Objectiu	Resultats
Bonetti et al. 2003 [64]	23 pacients amb cardiopatia isquèmica	Efecte del tractament	El RHI millora amb el tractament per la cardiopatia isquèmica
Kuvin et al. 2003 [57]	89 pacients amb angor	Comparar PAT i FMD	PAT i FMD es correlacionen i també amb els factors de risc CV
Bonetti et al. 2004 [55]	94 pacients amb malaltia CV	PAT i estimulació endotelial amb Ach	RHI és inferior en la disfunció endotel·lial coronària
Nohria et al. 2006 [60]	19 adults sans	PAT i inhibidor eNOS	RHI és dependent d'ON
Haller et al. 2007 [58]	44 infants	PAT en diabetes	RHI menor en nens diabètics
Aversa et al. 2008 [65]	20 pacients amb DM2	PAT, FMD i sildenafil	El sildenafil augmenta la hiperèmia amb PAT i FMD
Dhindsa et al. 2008 [66]	40 adults sans	PAT i FMD simultanis	PAT i FMD mostren correlació amb la hiperèmia, no amb la PWA
Hamburg et al. 2008 [62]	1957 adults de població general	Relació PAT i factors de risc CV	El RHI és inferior en Homes, en l'obesitat, perfil lipídic alterat, DT2, tabac, tractament amb hipolipemiants i augmenta amb l'edat.
Matsuzawa et al. 2010 [67]	140 dones amb angor	PAT coma predictor d'isquèmia coronària	El RHI és inferior en isquèmia
Rubinshtein et al. 2010 [63]	329 pacients amb risc CV	PAT i hospitalització cardíaca a 7 anys	El RHI s'associa a més risc d'hospitalització
Hamburg et al. 2011 [59]	4352 PAT i 7031 FMD en població general	PAT i FMD amb factors de risc CV	No es demostra la mateixa correlació amb els diferents factors de risc CV

**Taula 1.** Principals estudis realitzats amb EndoPAT-2000 i risc cardiovascular.

S'ha establert que un valor de RHI inferior a 1,66 indicaria disfunció endotelial i per tant, un major risc cardiovascular. No obstant això, els valors de normalitat, probablement varien en funció de la població, zona geogràfica, estil de vida. Per a l'estudi de la rigidesa arterial central, l'EndoPAT 2000 proporciona l'índex d'augment. Quantificat amb aquesta tècnica, s'ha comparat amb la tonometria radial assolint una molt bona correlació [58], s'ha relacionat amb funció anormal ventricular esquerra i elasticitat aòrtica [68] i un estudi amb pacients hipertensos ha demostrat que el metoprolol disminueix l'índex d'augment [69]. La inflamació en la psoriasis també s'acompanya d'un índex d'augment incrementat per EndoPAT-2000 [70] així com el tractament amb vardenafil ha mostrat millora de la rigidesa arterial d'aquells pacients amb disfunció erèctil d'origen vascular [71].

#### 3.3.2.2. La funció endotel·lial

L'endoteli és la monocapa de cèl·lules endotelials que cobreix la superfície interna de tot el sistema vascular i situat a la capa més interna de la paret arterial, la íntima. L'endoteli és el principal regulador de l'homeòstasi vascular i representa una barrera dinàmica entre la sang circulant i els teixits subjacents. Està doncs, contínuament exposat tant a estímuls mecànics, el flux sanguini i la pressió arterial, com també a nombrosos estímuls químics, procedents de les cèl·lules sanguínies i del sèrum. L'endoteli regula el to vascular, en part influenciat per aquest agents químics i mecànics, alliberant factors regulador, com són les prostaglandines i l'òxid nítric [72]. Es comporta com un òrgan de regulació vascular i és l'encarregat de mantenir el balanç entre la vasodilatació i la vasoconstricció, la inhibició i estimulació de la proliferació i la migració de les cèl·lules musculars llises, i la trombogènesi i la fibrinòlisi [73]. Aquest equilibri es pot veure alterat en presència dels factors de risc cardiovascular clàssics i emergents: hipercolesterolèmia, la hipertensió, la diabetis, la obesitat i la inflamació sistèmica entre d'altres.

En aquestes condicions, l'endoteli pot adoptar un fenotip que facilita la inflamació, la trombosi, la vasoconstricció i la formació de la lesió ateroscleròtica. Aquest procés anomenat disfunció endotel·lial es creu un dels primers passos en la patogènia de l'aterosclerosi, responsable de la formació de la placa [42, 44]. La principal característica de la disfunció endotel·lial és la disminució de la biodisponibilitat del vasodilatador més potent, l'òxid nítric. La deficiència de l'activitat o producció d'aquesta molècula és un mecanisme important de la disfunció i desenvolupament de l'aterosclerosi [2].

El dany a l'endoteli promou la secreció de molècules vasodilatadores, vasoconstrictores i l'augment de la permeabilitat vascular amb la conseqüent infiltració de lipoproteïnes a l'espai subendotelial, així com també afavoreix l'agregació plaquetària, l'adhesió de leucòcits i la generació de citosines inflamatòries. El paper de l'endoteli en estat normal i en la disfunció endotelial durant l'arteriosclerosi ha estat d'interès en l'estudi del tractament amb hipolipemians, hipotensors i hipoglucemians per tal de restablir una correcta funció endotelial.

Un mecanisme associat a la disfunció endotelial en DM2 i la HTA és l'alteració de la via de senyalització que dóna lloc a l'activació de l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) en l'endoteli vascular. L'ON es produeix en les cèl·lules endotelials i es genera a partir de la conversió enzimàtica de la L-arginina a ON i citrulina, gràcies a l'acció de l'enzim eNOS. Aquest enzim s'expressa de forma constitutiva en les cèl·lules endotelials i és localitzat a les caveoles, invaginacions de la membrana plasmàtica riques en lípids i proteïnes com la caveolina-1. L'enzim pot ser activat per l'estimulació de les cèl·lules endotelials pel receptor-dependent d'agonistes vasoactius com l'acetilcolina (Ach) i la serotonina, que promouen l'increment de calci intracel·lular. Alternativament, eNOS pot ser activat per la bradicinina, la pressió hemo dinàmica (*shear stress*), els estrògens i la insulina. El resultat és la producció directa de NO el qual s'expandeix localment per la paret arterial i activa la GC en les cèl·lules musculars, donant lloc a la vasodilatació arterial.

Aquesta via d'activació d'eNOS és independent a l'acció del calci intracel·lular [74, 75, 76].

A més de la vasodilatació, el NO impedeix l'adhesió dels leucòcits i la seva transmigració a la paret arterial, la proliferació de les cèl·lules vasculars del múscul llis, l'adhesió i agregació plaquetària i impedeix l'oxidació de les LDL. L'oxidació de les LDL és un mecanisme important en el procés ateroscleròtic, a més, les LDL oxidades del plasma es correlacionen directament amb el síndrome coronari agut. Les LDL oxidades augmenten la síntesi de caveolina-1, la qual redueix la producció del NO per inhibició de l'enzim eNOS. L'estrès oxidatiu pot interferir en la no-síntesi de NO independentment a les LDL a través de la producció de ROS (*espècies reactives d'oxigen*). Aquests efectes descrits del NO són importants en la protecció de l'aterosclerosi [42]. Per altra banda, altres vasodilatadors poden ser la prostaciclina i la bradicinina. La prostaciclina actua juntament amb el NO per inhibir l'agregació plaquetària, en canvi la bradicinina estimula la secreció de NO i prostaciclina contribuint a la mateixa funció. També la lipoproteïna HDL està associada a la vasodilatació coronària dependent d'ON [77] i a la vasodilatació perifèrica mesurada per FMD en persones sanes i també en pacients diabètics, dislipèmics i amb cardiopatia isquèmica [78-81]. Tot i això, la funció vasodilatadora de la lipoproteïna HDL en artèries de mida petita no ha estat avaluada. Les partícules HDL tenen efectes protectors sobre l'endoteli per diferents mecanismes, com estimular l'activitat de la sintasa de l'ON, augmentant-ne la vida mitja i per tan també la concentració [82]. Un altre mecanisme independent és que promouen l'augment del calci intracel·lular, que regula l'activitat de la sintasa d'ON [83]. L'endoteli també produeix substàncies vasoconstrictores, com poden ser l'endotelina, que és la molècula vasoconstrictora endògena més coneguda. L'angiotensina II, molècula també vasoconstrictora, actua com a prooxidant, estimulando la producció d'endotelina. Aquestes dues molècules promouen la proliferació i la migració de les cèl·lules musculars llises i contribueixen a la formació de la placa d'ateroma.

Els macròfags activats i les cèl·lules musculars llises vasculares, constituents de la placa, produeixen gran quantitat d'endotelina. El dany a l'endoteli altera el balanç entre la secreció de molècules vasodilatadores i vasoconstrictores i indueix diversos processos que promouen l'aterosclerosi [84, 85].

### 3.3.2.3. La rigidesa arterial.

La pressió arterial és un fenomen cíclic caracteritzat per una ona de pressió oscil·lant al voltant d'una pressió arterial mitjana, de la pressió diastòlica a la sistòlica, definint el pols de pressió. La impedància aòrtica és una mesura de l'oposició de la circulació a un flux oscil·latori, el volum d'atac generat pel treball cardíac. Aquesta impedància aòrtica integra factors que s'oposen a la ejecció ventricular esquerra, com la resistència perifèrica, les propietats viscoelàstiques i les dimensions de les grans artèries i la intensitat i sincronització de les ones de reflexió, a més de l'oposició a l'ejecció ventricular per les forces d'inèrcia. La rigidesa arterial és una de les manifestacions inicials dels canvis adversos estructurals i funcionals de la paret arterial. El procés degeneratiu de la elasticitat arterial s'anomena arteriosclerosi i s'ha de diferenciar de l'aterosclerosi, definida com la oclusió resultat de l'activitat inflamatòria, oxidació lipídica i formació de la placa d'ateroma. Ambdues condicions però, tendeixen a coexistir i comporten un procés progressiu, difús i relacionat amb l'edat que apareix en tots els territoris vasculars [86].

Els vasos arterials són estructures tridimensionals amb una mecànica complexa. Les artèries de mida gran tenen, a més de la seva capacitat de conducció del flux sanguini cap als teixits perifèrics, un efecte crític en la compensació de la contracció ventricular. D'aquesta manera, l'estructura varia força segons la seva situació i funció o bé coma reservori o bé com a sistema de conducció (principi de Windkessel). Així doncs, l'aorta proximal és rica en fibres d'elastina per ser capaç de suportar l'impuls sistòlic i acomodar el volum d'atac.

Per tan, la aorta toràcica i les seves branques immediates tenen una gran elasticitat, mentre que els vasos més llunyans del cor mostren major rigidesa degut a un predomini de fibres de col·lagen [87].

L'estrès correspondria a la força aplicada a una area concreta d'un objecte.

L'estrès circumferencial de la paret, definit per la llei de Laplace, està directament proporcionat a la pressió del vas i radi i inversament proporciona a la seva rigidesa. La tensió és la deformació resultant d'un objecte o material subjecte a una força d'estrès. D'aquí es pot extreure el model elàstic, que és la relació estrès/tensió. En la major part dels materials biològics, aquesta relació no és lineal, i la pendent defineix les propietats elàstiques del material. La rigidesa s'ha d'entendre com la resistència a la deformació i és resultat de la interacció complexa entre les cèl·lules musculars llises amb la matriu extracel·lular que conté elastina, col·lagen i fibres de fibrilina [88, 89].

La compliància arterial és el canvi absolut en l'àrea, o canvi en el diàmetre, per una determinada pressió sobre una longitud arterial fixa. És el contrari que la rigidesa. Per altra banda, la distensibilitat es defineix com la compliància relativa o canvi relatiu del diàmetre/area/pressió, la inversa del model elàstic. La morfologia de la ona de pols en l'arbre arterial és la suma de l'ona que progressa i la que retorna, aquesta ona és una energia que viatja per la paret de l'artèria i depèn de 3 factors: l'amplitud i durada de l'ejecció ventricular esquerra, l'amplitud de l'ona reflexa i la velocitat amb què aquesta ona es retornada des de la perifèria. El producte final, anomenat índex d'augment (AIx) pot estar afectat per altres variables, com la freqüència cardíaca, la fracció d'ejecció ventricular esquerra i la seva durada [90].

A llarg termini, la pulsatilitat i l'estrès mecànic acaben produint canvis estructurals a la paret i major rigidesa, així doncs, la rigidesa arterial també augmenta amb l'edat [91, 92].

La genètica sembla que també juga un paper important en el desenvolupament de la rigidesa arterial, s'han descrit polimorfismes de la metal·loproteïnasa 9 com a predictors independents de la rigidesa arterial [93].

La paret arterial té propietats elàstiques i viscloses, la diferència està en relació amb la resposta temps-dependent a la relació estrès-tensió (canvi de pressió-canvi de diàmetre). En presència de viscositat la paret arterial reté part de la deformació, d'aquesta manera es dissipa en part l'energia generada en l'expulsió ventricular. La viscositat és la responsable de mantenir un flux continu a l'aorta proximal i alhora garantir la perfusió coronària durant la diàstole [94].

La rigidesa arterial pot ser valorada per mètodes invasors i no invasors, clàssicament s'havia valorat la pressió de pols i la pressió arterial sistòlica, associant aquestes variables al risc de presentar malaltia vascular en múltiples estudis. Actualment s'han desenvolupat tècniques més sensibles, sobretot pel que fa referència a la rigidesa arterial central i la velocitat amb que viatja l'ona de pols per l'arbre arterial, que es poden determinar per tonometria arterial sense necessitat de procediments invasors. N'hi ha d'altres en desenvolupament, com són la mesura dels canvis en el diàmetre/pressió arterial mesurat per ressonància magnètica nuclear i l'índex CAVI (*cardio ankle vascular index*). Per la present tesi doctoral s'han utilitzat dos mètodes no invasors, la tonometria arterial perifèrica amb l'aparell EndoPAT-2000 que permet mesurar l'índex d'augment i l'índex turmell-braç.

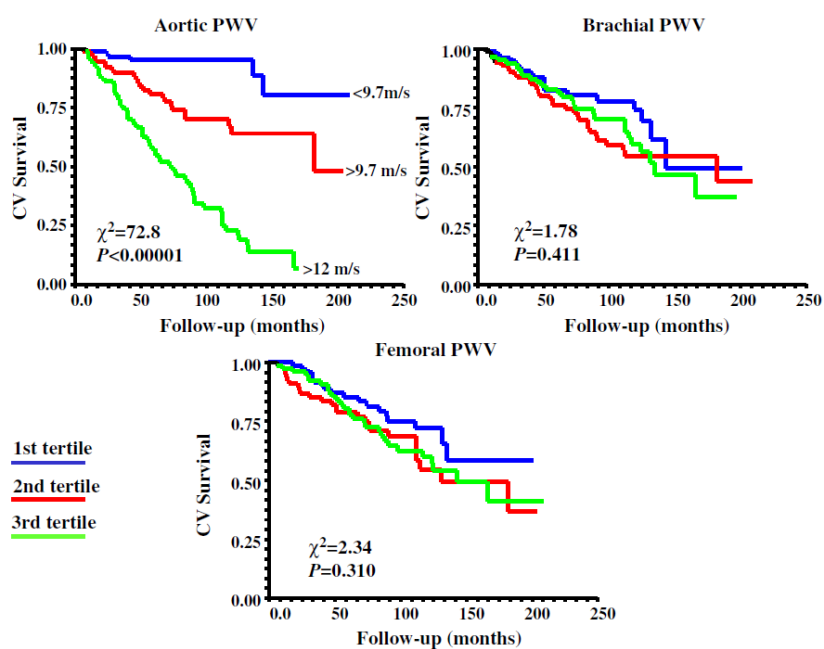
A continuació es comenten en les principals mesures de rigidesa arterial que es poden determinar per tonometria arterial perifèrica i l'ITB.

### **La velocitat d'ona de pols**

La mesura de la velocitat de l'ona de pols és la tècnica més acceptada, simple, robusta, no invasora i reproducible. La velocitat de l'ona de pols caròtida-femoral és una mesura directa i respon al model de propagació acceptat de l'arbre arterial. És la tècnica que actualment té més rellevància clínica. Avalua l'artèria en la seva totalitat estructural, geometria i propietats elàstiques intrínseques de la paret arterial. Es basa en dos aspectes, el temps de trànsit del pols arterial en un segment arterial i la distància entre dos punts de mesura.

Es pot mesurar en artèries centrals o perifèriques però la VOP aòrtica és la de major rellevància clínica i s'obté per l'estudi ecogràfic de l'arbre arterial en 2 punts amb registre electrocardiogràfic o per tonometria per aplanament i registre electrocardiogràfic [95]. Ha estat utilitzada en estudis epidemiològics demostrant el poder predictiu de la rigidesa arterial pels futurs esdeveniments cardiovasculars, en un estudi danès amb 1678 participants d'ambdós sexes i a 9,4 anys de seguiment, la VOP va ser la variable pronòstica sobre la mortalitat cardiovascular, esdeveniments cardiovasculars no fatals i cardiopatia isquèmica mortal o no mortal, després d'ajustar pels altres factors de risc cardiovascular [97, 97]. En la cohort de Framingham, en 2232 participants i 7.8 anys de seguiment, la VOP aòrtica augmentada va condicionar un 48% més de risc de presentar un primer esdeveniment CV tot i ajustar-se pels altres factors de risc i millorant també la predicció quan incorpora a un model clàssic de càlcul del risc, amb un 0.7% de millora en la discriminació [98]. Diversos tractaments hipotensors són capaços de reduir la VOP, en un metanàlisi recent es descriu que els inhibidors de l'enzim conversor de l'angiotensina són superiors als antagonistes del calci i al placebo en reduir la VOP si es tracta d'estudis a curt termini, mentre que en aquells altres treballs amb tractament de més llarga durada, els inhibidors de l'enzim conversor de l'angiotensina, els antagonistes del calci, els beta blocants i els diürètics foren tots superiors a placebo també en la reducció de la VOP [100].

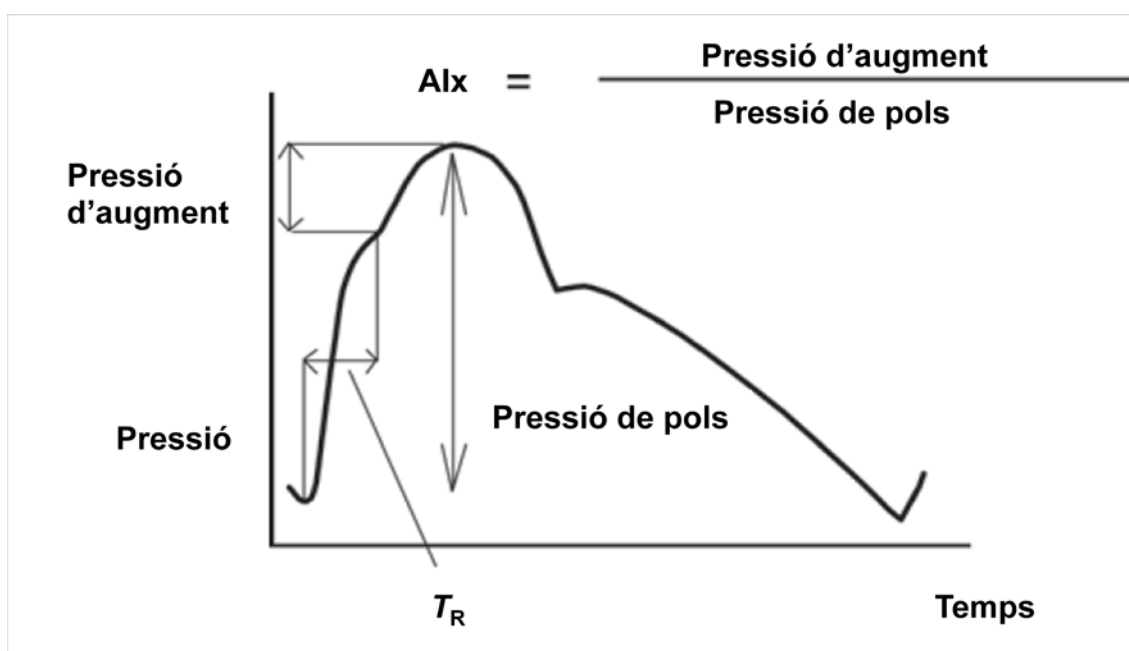




**Figura 8.** Supervivència de pacients amb insuficiència renal crònica segons la velocitat d'ona de pols a nivell aòrtic, braquial o femoral [95].

### L'índex d'augment

L'índex d'augment és una mesura de rigidesa arterial central. Derivat de l'anàlisi de l'ona de pols, és el resultat de la diferència entre la pressió d'augment i la pressió de pols (Figura 9), i s'expressa en percentatge. Tal i com passa amb la velocitat de l'ona de pols, l'índex d'augment amb major interès clínic és el derivat de l'ona de pols aòrtica, aquest es pot obtenir per una funció de transferència a partir de l'anàlisi de l'ona de pols perifèrica. L'Aix està molt influenciat per l'edat, la talla i la freqüència cardíaca, pel que en l'interpretació dels seus resultats s'han de considerar aquestes variables.



**Figura 9.** Esquema de l'ona de pols i les variables que defineixen l'índex d'augment.

S'ha demostrat que està associat als factors de risc CV com són la HTA, la DM2, la hiperhomocisteïnèmia, el tabaquisme i també al risc de futurs esdeveniments cardiovasculars. [101, 102] tot i que el seu ús a la pràctica clínica encara no és generalitzat. S'ha descrit que depenent de l'edat de la població estudiada es relaciona més amb uns factors de risc CV que d'altres, així en població jove s'associa a la hipercolesterolèmia, PCRus, tabaquisme, baix pes i activitat física pobra, mentre que en persones d'edat avançada es relaciona amb el pes i el tabaquisme, aquest estudi realitzat en 3432 persones del *The Copenhagen City Heart Study* mitjançant tonometria per aplanament de l'artèria radial, suggereix que probablement l'índex d'augment pot tenir més importància en les persones joves com a factor de risc pels futurs esdeveniments cardiovasculars [103]. Alguns fàrmacs pel tractament dels factors de risc CV poden influenciar el resultat de la rigidesa arterial central. L'estudi CAFE (*Conduit Artery Function Evaluation*), un subestudi del ASCOT (*Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial*) demostrà que un antagonista del calci, concretament amlodipí, front un

règim terapèutic hipotensor basat en atenolol en 2199 participants hipertensos i 4 anys de seguiment, fou capaç de disminuir de la rigidesa arterial central segons l'Alx, sense detectar-ne diferències significatives en la pressió arterial perifèrica en ambdues teràpies. Aquesta disminució assolida amb amlodipí es va acompanyar d'una disminució en la incidència d'esdeveniments cardiovasculars, procediments cardiovasculars i aparició de disfunció renal. Els inhibidors del sistema renina-angiotensina també han demostrat tenir efecte sobre la rigidesa arterial central, l'estudi TRANS (TRanscend arterial stiffNess Substudy), avalua l'efecte de telmisartan, els resultats finals encara no estan publicats però s'ha comunicat que telmisartan augmenta la distensibilitat arterial d'aorta abdominal, artèria caròtida i artèria braquial i en un estudi amb pacients amb diabetis mellitus tipus 1 i aliskiren, un inhibidor directe de la renina, amb mesures de VOP, Alx i FMD pre i post tractament, s'observà que l'aliskiren disminuï l'Alx, la VOP i augmentà la FMD de forma significativa [104-107]. L'avaluació no invasora de l'Alx es realitza per tonometria arterial perifèrica i no ha estat estudiat en la nostra població amb la tècnica EndoPAT ni tampoc la seva possible relació amb el GIMc.

### **Index turmell-braç**

L'Índex turmell-braç (ITB) és un bon mètode per classificar els pacients amb risc cardiovascular elevat. L'ITB és una tècnica no invasiva, fàcil de realitzar, que pot ser aplicada a nivell clínic. Es tracta de mesurar, mitjançant un Doppler, la pressió sistòlica en l'artèria humeral del braç, la tibial posterior i la pèdia de la cama i peu respectivament d'ambdós costats de l'individu (esquerre i dret). Es calcula el quocient per tots dos costats, en el qual en el numerador es posa el valor més alt de l'extremitat inferior i en el denominador el valor més alt de pressió de l'artèria humeral. Un ITB menor de  $<0,9$  o  $> 1,1$  en el cas de DM-2 es considera un marcador de malaltia arterial perifèrica i un indicador d'arteriosclerosi.

Per tant, els individus amb aquesta alteració han de ser tractats intensivament amb independència de la seva qualificació de risc cardiovascular. A la població de l'estudi ARIC, l'ITB es va correlacionar negativament amb el risc cardiovascular [108]. L'estudi MERITO mostra que aproximadament el 25% dels pacients diabètics asimptomàtics i els individus amb un risc cardiovascular intermedi presenten un ITB anormal [109].

### **3.4. MARCADORS BIOLÒGICS I ENDOTELI**

S'han descrit nombrosos marcadors biològics que afecten l'endoteli o bé en són sintetitzats per ell mateix. Alguns d'aquests marcadors participen en la disfunció endotel·lial, com les mol·lècules d'adhesió, les selectines i integrines, i citosines pro inflamatòries, provocant l'adherència de cèl·lules de la inflamació i defensa que acceleren el procés ateroscleròtic [110, 111, 112].

Les selectines i les integrines s'han relacionat tan amb els factors de risc CV com amb l'aparició d'esdeveniments cardiovasculars, recurrència i també amb el GIMc [113].

Un altre marcadors indirecte de valorar la funció endotelial és la concentració i funció de cèl·lules endotelials progenitores circulants, inversament relacionades amb la disfunció endotelial [114].

#### **3.4.1. Molècules d'adhesió endotelials**

Les molècules d'adhesió són proteïnes responsables de l'adhesió entre diferents tipus cel·lulars com cèl·lules endotelials, monòcits, limfòcits, plaquetes, cèl·lules musculars llises o bé entre cèl·lules i la matriu extracel·lular. S'han classificat aquestes molècules en sis tipus de molècules d'adhesió: integrines (VLA-4), selectines (P-, E- selectines), immunoglobulines (ICAM1, VCAM1, PECAM-1), cadherines, proteoglicans i mucines.

Les molècules d'adhesió poden expressar-se constitutivament a la superfície de la membrana cel·lular o bé per la inducció d'un estímul. La interacció entre l'endoteli i els leucòcits circulants a través d' integrines, selectines i immunoglobulines és clau en el pas d'aquests a l'espai subendotelial durant la disfunció endotelial i el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica [115].

La selectina-E és una proteïna de la família de les selectines i s'expressa en la superfície de les cèl·lules endotelials estimulades. En el procés inflamatori, les selectines (E- i P-selectina, aquesta també present a les plaquetes) promouen una primera unió transitòria dels monòcits a l'endoteli anomenada *rolling*, de manera que augmenta el temps de contacte per permetre la unió a les integrines [116].

L'E-selectina circulant (sE-selectin) pot ser secretada per l'acció d'una proteasa o bé alliberada pel dany o activació cel·lular, la seva concentració correlaciona amb l'expressió de proteïna a la superfície cel·lular. Per això, la concentració de sE-selectina plasmàtica és un marcador d'activació o dany endotelial [110].

S'ha observat que els nivells de sE-selectina estan augmentats amb pacients amb síndrome coronària aguda en comparació amb població control [117] i també s'han associat a l'arteriosclerosi subclínica, concretament amb GIMc [118], i amb la resistència a la insulina [119].

La ICAM1 (molècula d'adhesió intercel·lular 1) i la VCAM1 (molècula d'adhesió vascular 1) són molècules d'adhesió, les quals tenen una estructura similar a les immunoglobulines. Són els lligands endotelials de les integrines expressades en els leucòcits i les plaquetes i faciliten l'adhesió endotelial i migració dels leucòcits circulants a l'espai subendotelial. La seva expressió de està augmentada en resposta a l'estímul de citosines inflamatòries i LDL oxidades. No són tan específiques de l'endoteli ja que poden expressar-se en altres tipus cel·lulars com els monòcits i les cèl·lules musculars llises.

Es troben presents la placa d'ateroma i es sobre expressades en cèl·lules endotelials procedents de models animals amb hipercolesterolèmia [120].

En estudis d'associació previs, s'han observat nivells elevats de sVCAM1 circulants en individus amb el GIMc [121] i totes dues amb la cardiopatia isquèmica i la presència de plaques d'ateroma a caròtides [122, 123].

### 3.4.2. L'oxidació lipídica

Les lipoproteïnes circulants, principalment LDL, poden travessar l'endoteli a causa de l'augment de la permeabilitat vascular en la lesió endotel·lial, i acumular-se en l'espai subendotelial. Llavors, les partícules LDL interaccionen amb proteoglicans i glicosaminoglicans de l'íntima, la qual cosa provoca la seva retenció i modificació oxidativa i proteolítica. A més, les LDL oxidades atrauen els monòcits cap a l'íntima on es diferencien en macròfags, que internalitzaran les partícules oxidades a través dels seus *receptors scavenger*, transformant-se en de cèl·lules escumoses, part constituent de la placa d'ateroma. L'activació del monòcit s'acompanya de síntesi de citosines pro inflamatòries, afectació del to vascular, augment de la permeabilitat vascular i coagulació, citotoxicitat i la proliferació de les cèl·lules musculars llises [2].

Els biomarcadors de l'estrès oxidatiu més utilitzats per a quantificar l'estat de peroxidació lipídica són: les LDL oxidades i els anticossos de les LDL oxidades circulants, la susceptibilitat de les LDL a l'oxidació [124]. Els nivells de LDLox es troben augmentats en la DM2, la HTA, el tabaquisme i la insuficiència renal [125] i s'associen a la presència d'arteriosclerosi subclínica i síndrome coronària aguda [126, 127], i s'han proposat com un predictor d'esdeveniments cardiovasculars futurs [128].

### 3.4.3. Molècules mediadores d'inflamació (IL6, TNF $\alpha$ , PCR)

Com que l'aterosclerosi té una patogènia inflamatòria molts estudis s'han interessat per trobar marcadors d'inflamació en aquest procés, els nivells elevats d'alguns marcadors són considerats factors de risc pel desenvolupament de la malaltia cardiovascular. La internalització dels leucòcits a la paret arterial està controlada per citosines pro inflamatòries, com les quimiotàctiques per neutròfils o limfòcits, entre aquestes destaquen les interleucines (IL) com la IL6 i les que atreuen monòcits, limfòcits, basòfils i eosinòfil com la (proteïna quimiotàctica de monòcits).

La IL6 és produïda tant per macròfags com per adipòcits [139]. Es troba en concentracions augmentades en individus obesos, amb dislipèmia aterògena i en estats de resistència a la insulina [130]. La IL6 pot participar en el desenvolupament de l'aterosclerosi, ja que s'expressa en les cèl·lules escumoses i en cèl·lules musculars llises de les lesions ateromatoses i promou la inflamació al estimular la síntesi de la proteïna C reactiva a nivell hepàtic [131].

El TNF $\alpha$  es sintetitza fonamentalment en el macròfag però també a l'adipòcit. Té diversos efectes sobre la paret arterial, a l'endoteli activa el factor de transcripció NF $\kappa$ B, que estimula la síntesi de molècules d'adhesió [132], inhibeix la síntesi d'eNOS, per tant, menor disponibilitat d'ON. El TNF $\alpha$  (igual que la IL6) estimula la producció de proteïna C reactiva, pel que contribueix a un procés inflamatori sistèmic que pot danyar la paret vascular, afavorint el procés ateroescleròtic [133]. S'han descrit concentracions elevades de TNF $\alpha$  en individus obesos i amb resistència a la insulina [134].

El marcador biològic d'inflamació més conegut i determinat és la proteïna C reactiva [135], és una proteïna reactant de fase aguda secretada pel fetge, però també està sintetitzada als macròfags, adipòcits i cèl·lules musculars llises.

A la paret vascular hi redueix la producció de ON i de prostaciclina, estimula la producció d'endotelina -1, vasoconstrictora, i de molècules d'adhesió, MCP-1 i ILs [136]. Hi ha una evidència científica del valor predictiu dels nivells mínimament elevats de PCR sobre el desenvolupament de la malaltia CV. Valors superiors a 2-3 mg/l s'associen a major risc CV i que podria ser una indicació de tractament més enllà d'altres factors de risc CV clàssics [137, 138, 139].

#### **3.4.4. La *Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4)***

Les proteïnes d'unió a àcids grassos, o FABPs, són una família de proteïnes intracel·lulars amb gran afinitat per lligands hidrofòbics com àcids grassos saturats i insaturats, eicosanoids i altres lípids [140].

Participen en el transport intracel·lular d'àcids grassos cap a enzims i diferents compartiments cel·lulars, modulant el metabolisme lipídic intracel·lular i regulant l'expressió gènica [141]. La funció principal d'aquestes proteïnes citoplasmàtiques és fer solubles els àcids grassos i el transportar-los cap a enzims i compartiments cel·lulars. FABP4 (A-FABP o aP2) s'expressa en adipòcits, sobretot durant la diferenciació adipocítica, macròfags, cèl·lules dendrítiques i també a l'endoteli microvascular [132]. Funciona com una xaperona citoplasmàtica que transporta àcids grassos de cadena llarga cap a compartiments subcel·lulars pel seu metabolisme, secreció o translocació al nucli, on regulen factors de transcripció. Els àcids grassos modulen l'activació de la proteïna cinasa C, de l'inhibidor de la cinasa kappa (IKK), que són mecanismes relacionats amb la resistència a la insulina i la SM [143, 144]. Els ratolins *Knock-out* per FABP4 estan protegits de la hiperinsulinèmia i de la resistència a la insulina induïda per l'obesitat, i els *Knock-out* tan per FABP4 com per ApoE mostren un alentiment en el procés ateroscleròtic [143]. Tot i que la FABP4 també es troba en plasma, la seva funció en aquest no és coneguda.



El nostre grup, ha demostrat que els nivells plasmàtics de FABP4 són més alts en aquells pacients amb obesitat, síndrome metabòlica, DM2, hiperlipèmia familiar combinada i lipodistròfia, per tan un marcador inicial de la síndrome metabòlica, resistència insulínica i possiblement de la futura presentació de DM2 [145-149]. També ha estat associada a la malaltia cardiovascular, GIMc i aterosclerosi coronària [150]. Hi ha evidències indirectes que FABP4 pot promoure la inflamació, la resistència insulínica i la dislipèmia aterògena. Encara que els mecanismes pels que FABP4 pot participar en aquestes malalties i factors de risc són desconeguts, estan probablement vinculats a l'estat hiperlipolític d'aquestes condicions dismetabòliques. La FABP4 es considera actualment un marcador de les alteracions del metabolisme del teixit adipós que poden influir en el perfil lipídic plasmàtic. Un estudi recent demostra que FABP4 té un efecte directe sobre el miocardi, disminuint-ne la contractilitat [151]. Per aquest motiu, es creu que FABP4 podria tenir efectes també en teixits perifèrics. En aquesta tesi doctoral es presenta un estudi que vincula la FABP4 amb la disfunció endotelial en la DM2.

### **3.5. Canvis terapèutics de l'estil de vida**

Els canvis terapèutics de l'estil de vida són la base fonamental del tractament no farmacològic dels factors de risc cardiovascular. La obesitat abdominal i altres factors de risc poden ser modificats amb teràpies educatives. Aquestes modificacions inclouen abandonar l'hàbit tabàquic, l'augment de l'activitat física i mantenir una dieta apropiada. Per altra banda, les evidències de que els canvis d'estil de vida redueixen la morbiditat i mortalitat són escasses [152, 153], tot i això, hi ha dades que evidencien efectes positius dels canvis d'estil de vida sobre marcadors indirectes del risc CV com són la funció endotelial i la inflamació, essent el tabac un dels principals factors que promouen la disfunció de l'endoteli [154-157].

Tot i que els estudis demostren que els canvis terapèutics de l'estil de vida no assoleixen grans canvis en els factors de risc, el benefici clínic va més enllà de la reducció de pressió arterial, el pes, el control de la glucèmia i aconseguir un perfil de lípids plasmàtics més "sa". Probablement el canvi que aconseguix un efecte més clar a curt i llarg termini és deixar de fumar [158-160].

El principal problema de la implantació dels canvis terapèutics d'estil de vida consisteix en la baixa adherència i compliment per part dels pacients, estant descrites fallides de fins al 50% dels participants [161].

En un estudi amb intervenció de canvis d'estil de vida a 36 mesos, en 151 pacients d'ambdós sexes amb risc CV moderat i alt, el grup d'intervenció disminuï el perímetre abdominal 2.2 cm, la pressió arterial sistòlica 4.9 mmHg, la pressió arterial diastòlica 1.6 mmHg i augmentaren l'exercici aeròbic en un 5%. Per contra, en aquest estudi no es varen observar canvis en el perfil lipídic ni en la glucèmia [162]. I en un altre estudi amb 5 anys de seguiment, basat sobretot en l'increment de l'exercici físic, sí es demostrà una disminució significativa dels nivells plasmàtics de colesterol LDL, triglicèrids i un augment del colesterol HDL així com una disminució també significativa de la pressió arterial [163]. En la present tesi doctoral, un dels estudis que la componen, ha volgut demostrar els efectes beneficiosos dels canvis terapèutics d'estil de vida sobre la reactivitat hiperèmica de les artèries digitals de pacients amb obesitat abdominal.

Recomanacions generals de canvis d'estil de vida:

- Pes i activitat física: tan la obesitat com la obesitat únicament abdominal contribueixen a la dislipèmia, per tan, la ingesta calòrica en aquests casos hauria de disminuir i per altra banda s'hauria d'incrementar la despesa energètica. La disminució del pes corporal, inclús en només un 5-10%, millora les anomalies lipídiques i també els altres factors de risc concomitants.

- Aquesta disminució de pes es pot aconseguir evitant el consum d'aliments molt energètics induint un descens de 300-500 kcal/dia. Per a que aquest canvis siguin efectius a llarg termini s'han d'incloure a un programa global estructurat. L'exercici físic recomanat ha de ser de grau moderat i regular, s'ha demostrat molt efectiu en la prevenció de la DM2 i en la millora dels factors de risc CV relacionats amb la resistència a l'insulina. S'hauria de practicar aquest exercici físic durant almenys 30 minuts al dia.
- Greix de la dieta: les recomanacions de greix total de la dieta són del 25 al 35% de les calories en l'adult, quan aquest percentatge és superat s'associa en general, amb un augment del greix saturat i de d'ingesta calòrica. Per contra, una ingesta inadequada de greix i olis pot contribuir a ingesta inadequada de vitamina E i àcids grassos essencials i a canvis desfavorables en la lipoproteïna HDL. El tipus de greix de la ingesta hauria de basar-se en àcids grassos mono insaturats i en poliinsaturats tan omega-6 com omega-3. El greix saturat ha de correspondre a com a màxim el 10% de la ingesta calòrica total. La ingesta de poliinsaturats omega 6 s'hauria de limitar a < 10% de la ingesta calòrica total, per tal de prevenir la peroxidació lipídica de les lipoproteïnes i el descens del colesterol HDL. [20] Estudis observacionals suporten la recomanació de la ingesta de peix i àcids grassos omega-3 de fonts vegetals, ja que poden reduir el risc de mort CV i ictus, encara que no tenen efectes importants en el metabolisme lipoproteic plasmàtic. La complementació farmacològica d'omega-3 redueix el nivell de triglicèrids, però a altes dosis pot augmentar el colesterol LDL. La ingesta de colesterol de la dieta hauria de ser < 300mg/dia. Limitar el consum d'aliments processats amb greixos trans es la forma més efectiva de reduir la ingesta de greix trans per sota el 1 % de l'energia total. La font principal de greix trans és la indústria alimentaria, ja que <80% del greix trans ingerit prové de la hidrogenació parcial d'olis vegetals.

- **Carbohidrats i fibra:** els hidrats de carboni han de contribuir al 45-55% de l'energia total de la ingesta. El consum de vegetals, llegums, fruita, fruits secs i cereals integrals ha de ser especialment recomanat, juntament amb altres aliments rics amb fibra i amb baix índex glucèmic. Una dieta modificada segons el greix que incorpora uns 25-40g de fibra, incloent almenys 7-13g de fibra soluble, és ben tolerada, efectiva i recomanada pel control de la dislipèmia. Per contra, no hi ha justificació per recomanar una dieta molt baixa en hidrats de carboni. La ingesta de sucres no hauria de superar el 10% de l'energia total ( a més del que hi ha contingut en la fruita i els suc). Un consell més restrictiu podria donar-se a aquelles persones que necessitin perdre pes o reduir els triglicèrids plasmàtics. Les begudes ensucrades s'haurien de limitar dràsticament en presència d' hipertrigliceridèmia.
- **Alcohol i tabac:** el consum d'alcohol de forma moderada (fins a 20-30g/dia en homes i 10-20g/dia en dones) és acceptable per aquelles persones que beuen begudes alcohòliques ja que no augmenta els triglicèrids. L'abandonament de l'hàbit tabàquic té uns clars beneficis en el risc CV global i específicament en el colesterol HDL [20].
- **Suplements dietètics i aliments funcionals:** tot i que hi ha diversos aliments funcionals i suplements dietètics amb el propòsit de millorar el risc CV no hi ha evidències en estudis a llarg termini. Els que gaudeixen de més treballs que recolzen la seva utilitat són els fitosterols, que a dosi de 1-2 g/dia es podrien considerar com a tractament per aquells pacients amb colesterol total o LDL elevada en els que el càlcul del risc CV global no justifica la teràpia hipolipemiant.
- **Altres:** la dieta ha de ser rics en fruites i vegetals per tal d'obtenir varietat d'antioxidants. Almenys s'ha de consumir de 2 a 3 racions de peix per setmana i el consum regular de fonts d'omega-3 com les nous o la soja.

- La ingesta de sal hauria de ser menor de 5g/dia, no només com a condiment sinó també reduint la ingesta d'aliments conservats en sal, aquesta recomanació podria ser més restrictiva en aquells pacients amb HTA o síndrome metabòlica [20].

En aquesta tesi doctoral es presenta un treball que avalua els canvis terapèutics d'estil de vida individualitzats sobre la reactivitat hiperèmica de les artèries perifèriques de mida petita.



## 4. Hipòtesi





Els pacients amb risc cardiovascular moderat presenten alteracions de la reactivitat de les artèries de petita mida i de la rigidesa arterial central. Aquestes alteracions funcionals estan associades a d'altres morfològiques, com el gruix íntima mitja carotídi. Aquells pacients amb una menor reactivitat i major rigidesa presentaran també unes característiques antropomètriques i bioquímiques diferents.

Els canvis terapèutics d'estil de vida poden millorar la reactivitat de les artèries de petita mida.

La reactivitat hiperèmica de les artèries perifèriques es relaciona amb marcadors biològics de funció endotel·lial i de risc metabòlic.



## 5. Objectius



Els objectius concrets d'aquesta tesi són:

**1er Objectiu. Establir els determinants clínics i analítics de la reactivitat hiperèmica d'artèries de petita mida i la rigidesa arterial en pacients amb risc cardiovascular elevat.**

- A. Estudi de la reactivitat hiperèmica i els seus determinants clínics i analítics.
- B. Estudi de la rigidesa arterial mitjançant la determinació de l'índex d'augment i la seva associació amb els factors de risc, dades analítiques i el gruix íntima mitja carotídi.
- C. Estudi de la rigidesa arterial en pacients amb hipercolesterolèmia familiar i la seva relació amb el gruix íntima-mitja carotídi.

**2on Objectiu. Demostrar que els canvis terapèutics d'estil de vida poden millorar la reactivitat hiperèmica de les artèries de petita mida.**

- D. Estudi prospectiu a 1 any de l'efecte dels canvis terapèutics d'estil de vida sobre la reactivitat hiperèmica en pacients amb obesitat abdominal.

**3er Objectiu. Relacionar la reactivitat hiperèmica de les artèries de petita mida amb biomarcadors sèrics de funció endotel·lial i metabòlics.**

- E. Estudi de la associació de la reactivitat hiperèmica amb marcadors de funció endotel·lial, inflamació i d'oxidació.
- F. Estudi dels nivells de FABP4 en la diabetis mellitus tipus 2 en comparació amb pacients no diabètics i la seva relació amb la reactivitat hiperèmica.



## 6. Materials i Mètodes





Els dissenys dels estudis, descripció de la població i materials i mètodes que formen part de la tesi doctoral estan descrits en cada un dels articles adjunts, si més no, seguidament se n'adjunten les explicacions generals.

### **6.1. Població estudiada**

La població en que es basen els diferents estudis ha estat obtinguda de les consultes de Lípids i Hipertensió arterial de la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus.

Aquesta població consta de 816 persones d'ambdós sexes amb una edat mitjana de 54.5 anys, amb risc cardiovascular global moderat i sense evidència de malaltia cardiovascular establerta en el 94,6% dels casos. El diagnòstic de síndrome metabòlica s'efectuà segons els criteris actuals de consens [164].

A tots els participants se'ls realitzà:

1. Anamnesi i estudi antropomètric: es va dur a terme una historia clínica complerta, la exploració física i es van recollir els paràmetres antropomètrics i es va fer la valoració global del risc CV.
2. Estudi vascular: es va realitzar la valoració de la funció vascular per tonometria arterial perifèrica i índex-turmell braç i l'estudi morfològic per ecografia carotídia del GIMc. La tonometria arterial perifèrica s'efectuà a tots els individus abans de l'extracció de sang.
3. Estudi bioquímic i de biomarcadors circulants endotelials, d'inflamació d'oxidació lipídica: a partir del plasma o del sèrum es van determinar les concentracions de la proteïna FABP4 i es van quantificar les concentracions dels biomarcadors circulants: selectina-E, VCAM1, ICAM1, TNF $\alpha$ , IL6, LDL oxidades i els anticossos de les LDL oxidades.

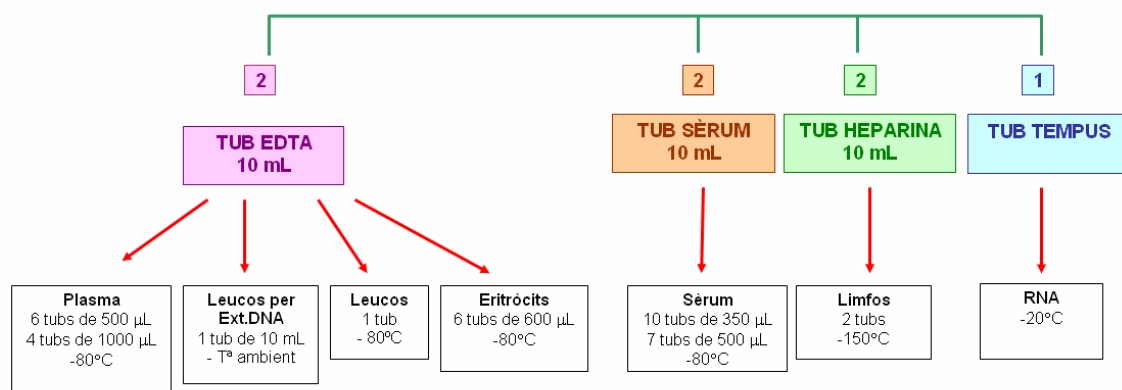
L'estudi es va dur a terme mentre els pacients continuaven amb tractament pel control dels factors de risc CV segons els protocols dels facultatius de l'hospital, excepte pels pacients diagnosticats d'hipercolesterolèmia familiar en els que es va dur a terme un període de rentat que consistí en 4 setmanes sense tractament per les estatines i 6 setmanes pels fibrats.

## 6.2. Aspectes ètics

L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic i d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus amb data 5.04.2005 amb N<sup>o</sup> referència 05-03-31/3proj2, i tots els participants van signar el consentiment informat (veure Annex).

## 6.3. Mostres obtingudes. Anàlisi bioquímica.

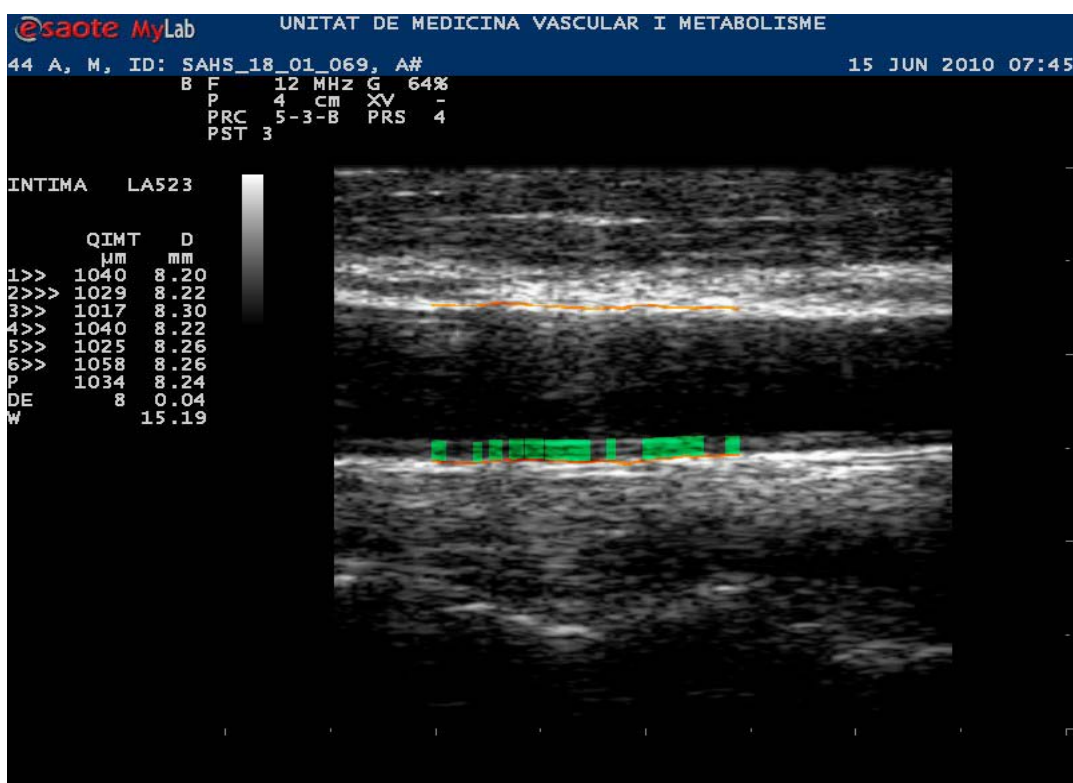
Les mostres de sang es van obtenir després d'un període de 12 hores en dejú, centrifugades (2500rpm, 15min) immediatament i guardades a -80°C, al Banc de Mostres Biològiques (Biobanc) de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus. A partir de les alíquotes de plasma i sèrum es va realitzar l'anàlisi bioquímica. Els paràmetres bioquímics estàndards es van determinar en sèrum mitjançant mètodes normalitzats del laboratori clínic. Les concentracions de colesterol, triglicèrids, glucosa, LDL i HDL directe i de PCR ultra sensible van ser mesurades utilitzant assaigs enzimàtics (ITC Diagnostics, Barcelona) o per immunoassaigs turbidimètrics (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Aquests mètodes van ser adaptats per l'auto analitzador *Cobas Mira Plus* (Roche Diagnostics). L'hemoglobina glicada (HbA1c) es va mesurar per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).



**Figura 10.** Esquema de l'obtenció de mostres i les alíquotes processades.

#### 6.4. Estudis morfològic i funcionals vascular.

L'estudi morfològic ha consistit en l'anàlisi del gruix íntima-mitja carotídi. Aquest s'ha realitzat amb els ecògrafs Acuson Sequoia (Siemens Medical Solutions, Germany) i MyLab 50 X-Vision® (Esaote® Italy, S.p.A.) equipats amb un transductor lineal de 5-12 Mhz. Aquests aparells realitzen la quantificació automàtica per radiofreqüència del gruix íntima mitja de la porció de la caròtida comú. Amb el pacient en decúbit supí i amb el cap inclinat uns 45 ° en un ambient tranquil, la avaluació de les porcions carotídies ha estat la següent: el gruix de la íntima-mitja de la caròtida comú s'ha realitzat un centímetre proximal a la bifurcació, en ambdós costats, caròtida dreta i esquerra, i detectant-ne 1 cm de longitud. També s'ha quantificat el gruix íntima-mitja de la bifurcació carotídià o bulb i de la caròtida interna, per detecció semiautomàtica amb un software específic (ThickSoft).

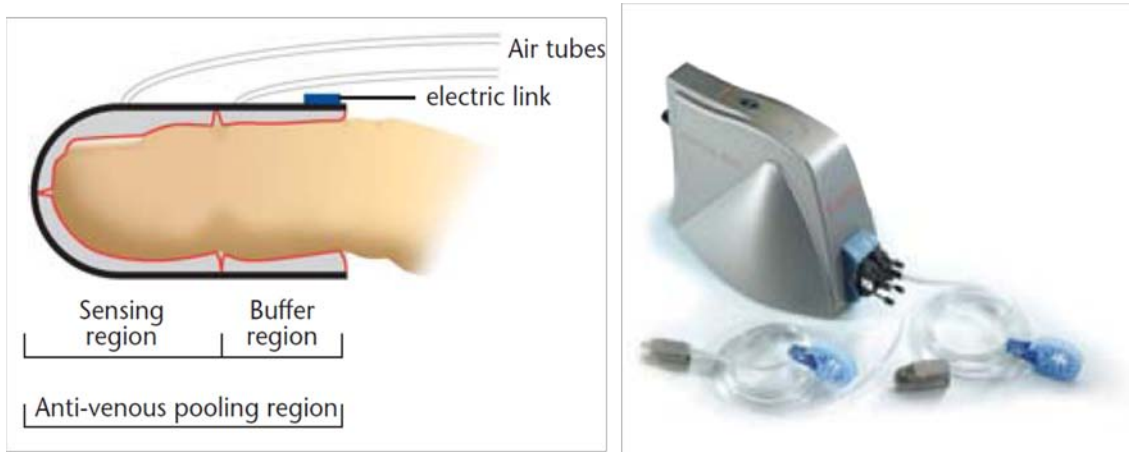


**Figura 11.** Detecció semiautomàtica per radiofreqüència del gruix íntima-mitja carotídi a nivell de la caròtida comú.

Els resultats s'expressen amb la mitjana i màxim d'ambdues caròtides comuns, mitjana i màxim d'algun dels sis territoris estudiats o bé mitjana i màxim del global dels sis territoris. A la vegada s'ha valorat la existència de placa d'ateroma definida segons els criteris actualment vigents. Les proves s'han efectuat amb el mateix operador per tal de disminuir el biaix. La metodologia seguida per dur a terme l'exploració ha estat la descrita per la *American Society of Echocardiography* [22]

L'estudi funcional vascular consistí en la determinació de la reactivitat hiperèmica a nivell digital que és un marcador indirecte de funció endotel·lial i de l'índex d'augment, un paràmetre de rigidesa arterial central.

L'estudi de la funció endotel·lial, mesurant la hiperèmia reactiva mitjançant tonometria arterial perifèrica, es va realitzar amb l'aparell EndoPAT-2000 (Itamar Medical, Caesarea, Israel) el qual mesura aquests canvis dependents de NO en l'endoteli en el to vascular, utilitzant bio-sensors digitals [60].



**Figura 12.** Aparell EndoPAT-2000 i esquema del bio-sensor digital.

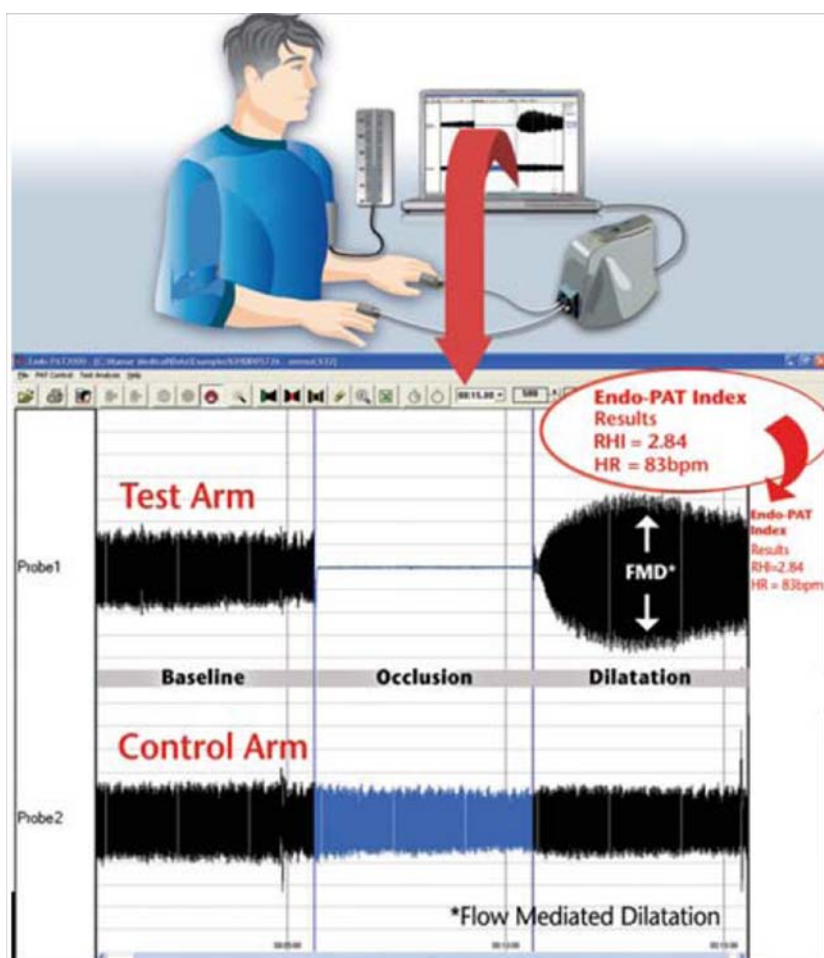
Els sensors valoren els canvis en el volum de l'ona de pols de les artèries digitals (PWA) els quals són percebuts per un transductor de pressió i analitzats directament pel software específic. Els bio-sensors en forma de didal consten d'una coberta externa, rígida i una superfície de làtex inflable en coixins pneumàtics en el seu interior. Els sistemes de pressió digital eviten la distensió venosa. Els canvis en el to arterial són provocats en resposta a una oclusió de l'artèria braquial induïda durant 5 min. Les mesures del braç control (en el procediment està indicat) són utilitzades per desestimar canvis no dependents de NO en el to vascular. El procediment va ser el següent:

Totes les valoracions es van realitzar a primera hora del matí (8 a 10h), abans de l'extracció de sang. Els pacients no podien portar cap objecte metàl·lic com per ex. rellotge, ni braçalets ni anells. La valoració es va dur a terme en un ambient agradable i tranquil, amb una temperatura ambiental controlada (18-22°C).

Els pacients eren col·locats en posició supina amb els braços i les mans a la mateixa alçada utilitzant un reposa-braç. El braçalet de pressió es va situar en el braç d'estudi (braç esquerre), i, en canvi, el braç dret ens va servir de control. Les sondes digitals es van col·locar al segon dit de cada mà i els dits del voltant es van separar amb l'ajuda d'una petita esponja per tal de no interferir. La valoració va començar amb el registre durant un període basal de 5 min, tot seguit es va inflar el braçalet de pressió fins a una pressió sistòlica superior a 50 mmHg de la del pacient, durant 5 min. A continuació, es va desinflar el braçalet induint la hiperèmia reactiva, la qual es va mantenir durant 5 min més. L'índex de la hiperèmia reactiva (RHI) va ser analitzat per l'ordinador, independent d'operador. La mitjana de l'amplitud de la senyal del PAT durant la post oclusió es divideix per la mitjana de l'amplitud de la senyal del PAT abans de ser inflat en estat basal (3.5 min). El valor de RHI va ser normalitzat pel braç control per compensar possibles canvis sistèmics.

De l'anàlisi de l'amplitud de l'ona de pols se'n deriva el càlcul de l'índex d'augment, un paràmetre que, tal com s'ha explicat anteriorment a la Introducció, dona informació de la rigidesa arterial central. Aquesta variable es calcula automàticament pel software de l'EndoPAT-2000.

Els avantatges principals són que és un mètode reproduïble i independent d'operador, és a dir, no existeixen interpretacions subjectives de l'augment de diàmetre associat amb els ultrasons tant en l'artèria braquial com en la FMD. A més, representa un mètode no invasiu per la mesura indirecta de la funció endotel·lial coronària, fàcil d'utilitzar i optimitzar. En la nostra Unitat he realitzat un test de reproduïbilitat d'aquesta prova essent els resultats els següents: variabilitat del test: 17%, coeficient de correlació intra classe: 0.52 i variació intra individu 0.19. Aquestes variacions són similars a les ja observades en altres estudis de reproduïbilitat.



**Figura 13.** Representació gràfica del registre de la tonometria arterial perifèrica per determinar la reactivitat hiperèmica digital.

### 6.5. Anàlisi de citoquines: *Human cytokine antibody array*.

L'expressió diferencial de citosines inflamatòries i molècules d'adhesió es va determinar mitjançant un microarray múltiple *Human Cytokine Antibody Array* de RayBiotech (Norcross, GA; EUA). Aquesta tècnica mesura simultàniament 5 citosines per mitjà de la tècnica ELISA. Consisteix en col·locar 5 anticossos de les citosines específiques respectivament a la superfície de vidre on es realitza l'experiment i en la qual s'afegeixen les mostres i per tant s'obtenen els nivells plasmàtics de les 5 citosines simultàniament.

Es van utilitzar un parell d'anticossos específics per cada citosina per a la detecció. L'anticòs primari es va situar en la superfície del vidre. Després de la incubació amb la mostra, la citosina va ser unida a la superfície sòlida. Un segon anticòs secundari, marcat amb biotina, es va afegir. Aquest és capaç de reconèixer un epítrop diferent de la citosina. El complex de citosines-anticòs-biotina pot ser visualitzat a través de l'addició de l'estreptavidina, marcada amb fluorescència, i utilitzant un lector de plaques en el qual es van llegir les mostres a 555-565nm.

L'avantatge d'aquest mètode és que a partir de microarrays múltiples es poden afegir diversos anticossos específics per citosines en el suport de vidre, i realitzar una detecció múltiple de les concentracions de citosines en un únic experiment, per tant, en la mateixa mostra es poden mesurar simultàniament les 5 molècules. Per a la quantificació de citosines, la concentració va ser determinada a partir d'una corba estàndard generada per cinc punts estàndards de cada citosina. En un experiment, els estàndards per cada citosina i les mostres van ser analitzades en cada matriu de forma simultània a través de la tècnica ELISA. Els resultats es mostren en ng/ml per sVCAM1, sICAM1, sE-selectina i pg/ml per TNF $\alpha$  i IL6. Els coeficients de variació inter-assaig i els coeficients de variació intra-assaig dels biomarcadors van ser <12% i <10%, respectivament.

#### **6.6. Anàlisi de les partícules LDL oxidades i anticossos de les LDL oxidades.**

L'estudi dels biomarcadors circulants d'oxidació lipídica es va realitzar mitjançant una tècnica quantitativa immunoenzimàtica d'ELISA de tipus sandvitx. Aquest mètode va ser utilitzat per determinar els valors plasmàtics de LDL oxidades i dels anticossos de LDL oxidades en sèrum, seguint el procediment recomanat pels kits comercials.

Per quantificar les LDL oxidades en plasma, es va utilitzar la tècnica d'immunoassaig en fase sòlida (amb 2 llocs d'unió) del kit comercial ELISA Mercodia Oxidized LDL ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Sweden).



Aquest kit utilitza l'anticòs monoclonal murí específic, mAb-4E6, que Holvoet et al. presenta en les seves publicacions, el qual es va fer servir per quantificar les concentracions de LDL oxidades en plasma en el seu estudi. La intensitat de la reacció colorimètrica va ser mesurada pel lector de plaques d'ELISA (Bio Whittaker) a la longitud d'ona de 450nm. Els resultats es van obtenir amb U/L i han estat expressats com la relació LDL oxidades/LDL colesterol (U/mmol). Les característiques representatives de l'assaig són 6.3% pel coeficient de variació intra-assaig i 4.7% pel coeficient de variació inter-assaig

Per l'estudi dels anticossos de les LDL oxidades en sèrum es va realitzar una tècnica quantitativa immunoenzimàtica d'ELISA de tipus sandvitx i seguint el procediment recomanat pels kits comercials.

Les concentracions en sèrum dels anticossos de les LDL oxidades van ser quantificades mitjançant els kits comercials d'ELISA *IMTEC-ox-LDL-antibodies* (IMTEC Immunodiagnostika GmbH, Berlin, Germany). Aquest test permet la determinació simultània d'autoanticossos anti-LDL oxidades IgM i IgG després de sostroure els autoanticossos anti-LDL nativa. La intensitat de la reacció colorimètrica va ser mesurada pel lector de plaques d'ELISA (Bio Whittaker) a la longitud d'ona de 450nm.

Els resultats van ser expressats en U/mL. Les característiques representatives de l'assaig són 7.8% pel coeficient de variació intra-assaig i 8.6% pel coeficient de variació inter-assaig.

### **6.7. Estudi de la FABP4 circulant per la tècnica d'ELISA**

Les concentracions plasmàtiques de FABP4 circulant van ser valorades fent servir kits comercials de la tècnica d'ELISA (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic). Concretament, aquesta quantificació es va realitzar mitjançant una tècnica quantitativa immunoenzimàtica d'ELISA de tipus sandvitx i es van determinar les concentracions de FABP4 en plasma seguint el procediment recomanat pel kit comercial.

1. El kit proporciona una placa de 96 pouets. En cada pou, estava fixat un anticòs monoclonal pel biomarcador FABP4.
2. Es van dispensar els estàndards (de concentracions conegudes) o les mostres (plasma procedent dels individus de l'estudi) en cada pou per analitzar la presència de l'antigen complementari. Totes les mostres es van determinar per duplicat.
3. Després del rentat de tots els pous per descartar la resta de proteïnes que no havien quedat unides, es va afegir l'anticòs primari específic de FABP4 amb l'enzim conjugat (amb la peroxidasa).
4. Tot seguit, es va dur a terme el rentat per eliminar l'excés de reactiu i es va afegir la solució de substrat, la qual va desenvolupar color en proporció de la quantitat de biomarcador unit.
5. Finalment, la reacció colorimètrica va ser aturada per la solució stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i la intensitat del color va ser mesurada pel lector de plaques d'ELISA (Bio Whittaker) a la longitud d'ona de 450nm.

Per comparació de la densitat òptica de la mostra amb la corba estàndard, es va determinar la concentració de FABP4 mitjançant l'anàlisi de les dades computades per l'absorbància dels estàndards versus la concentració utilitzada en una regressió polinòmica de 4rt grau.

Els resultats són expressats en ng/ml. Les característiques representatives de l'assaig són <5% pel coeficient de variació intra-assaig i <8% pel coeficient de variació inter-assaig.

## 6.8. Anàlisi estadística.

Els procediments estadístics concrets estan descrits en cada un dels estudis però a continuació se'n descriuen els generals.

Per a comprovar la normalitat de les variables es va fer servir el test de Kolmogorov-Smirnov. Les variables contínues són presentades com la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard per les dades en distribució normal i com la mediana (percentil 25 - percentil 75) per les dades que no segueixen una distribució normal i com a freqüències (n) o percentatges (%) per les variables categòriques. Les variables amb distribució no-normal com és el RHI, van ser transformades a logaritmes o bé tractades amb tests no paramètrics segons l'anàlisi efectuat, com per exemple la variable FABP4. normals. Per a les comparacions entre grups s'utilitzà una anàlisi de la variància (ANOVA) o el test no-paramètric U de Mann-Whitney. L'associació univariant va ser analitzada amb les correlacions Spearman o

Pearson. Les diferències entre els grup de tercils de sE-selectina van ser determinades mitjançant *two-way* anàlisi de la variància (ANOVA). Les diferències entre els grups de tercils de FABP4 van ser determinades amb el test de la Chi quadrat. Els predictors de l'anàlisi per regressió *stepwise* van ser seleccionats per l'anàlisi de correlació i entre les variables conegudes que sabem que es troben associades a la variable dependent. Les diferències van ser considerades significatives quan  $P < 0.05$ .

Per a l'anàlisi estadística es va utilitzar el programa SPSS versions 17.0 i 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).



## 7. Estudis



## 1er Objectiu





**1<sup>er</sup> Objectiu. Establir els determinants clínics i analítics de la reactivitat hiperèmica d'artèries de petita mida i la rigidesa arterial en pacients amb risc cardiovascular moderat.**

- A. Estudi en 816 pacients atesos a la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme de la reactivitat hiperèmica i els seus determinants clínics i analítics.
- B. Estudi de la rigidesa arterial en 816 pacients amb risc cardiovascular moderat mitjançant la determinació de l'índex d'augment i la seva associació amb els factors de risc i dades analítiques.
- C. Estudi de la rigidesa arterial en 125 pacients amb hipercolesterolèmia familiar i la seva relació amb el gruix íntima-mitja carotídi.

**Articles i estudis.**

Ferré R, Aragonès G, Plana N, Merino J, Heras M, Buixadera C, Masana L. High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1 levels strongly influence the reactivity of small peripheral arteries. *Atherosclerosis*. 2011 May;216(1):115-9.

Ferré R, Aragonès G, Plana N, Merino J, Heras M, Buixadera C, Masana L. La rigidesa arterial mesurada per l'índex d'augment és un determinant del gruix íntima-mitja carotídi en pacients amb risc cardiovascular moderat.

N Plana, R Ferré, J Merino, G Aragonés, Girona J, Heras M, LI Masana. Heterozygous familial hypercholesterolaemic patients have increased arterial stiffness, as determined with the augmentation index. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2011. En premsa.



## 7.1. Estudi A

*Títol: High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1 levels strongly influence the reactivity of small peripheral arteries.*

Atherosclerosis. 2011 May;216(1):115-9.

**Objectiu:** La reactivitat hiperèmica posterior a una isquèmia controlada és un marcador indirecte de la funció de l'endoteli vascular. Els mecanismes que controlen la capacitat de dilatació de les artèries perifèriques de petita mida no són ben coneguts. Aquest estudi avalua la hiperèmia reactiva mitjançant la tonometria arterial perifèrica en les artèries acres i estudia els seus determinants clínics i bioquímics.

**Mètodes:** es varen reclutar 816 pacients amb risc cardiovascular moderat. La reactivitat hiperèmica de les artèries digitals es mesurà per tonometria arterial perifèrica. S'analitzaren també les dades de la història clínica i característiques antropomètriques i dades bioquímiques. Es van estudiar les associacions entre els factors clínics, bioquímics i la reactivitat hiperèmica.

**Resultats:** Els nivells de colesterol HDL i d' apolipoproteïna A1 van mostrar una forta i directa correlació amb una millor resposta vasodilatadora. Alguns components de la síndrome metabòlica, com el perímetre abdominal i la hipertrigliceridèmia, i el tabaquisme s'hi van associar de forma inversa, així com també els marcadors inflamatoris a sèrum. Els predictors de la reactivitat hiperèmica d'artèries perifèriques petites foren el colesterol HDL amb un efecte protector i el tabaquisme amb un impacte negatiu.

**Conclusions:** Els nivells de colesterol HDL i d' apolipoproteïna A1 tenen una forta correlació positiva amb la hiperèmia reactiva d'artèries de petita mida, mentre que el tabaquisme, el perímetre abdominal i la trigliceridèmia s'hi associen de forma inversa. El colesterol HDL és el principal determinant de la resposta vasodilatadora posterior a una isquèmia en artèries perifèriques de petita mida.



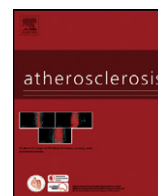


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Atherosclerosis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/atherosclerosis](http://www.elsevier.com/locate/atherosclerosis)



## High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1 levels strongly influence the reactivity of small peripheral arteries

Raimon Ferré<sup>a,b,\*</sup>, Gemma Aragonès<sup>a,b</sup>, Nuria Plana<sup>a,b</sup>, Jordi Merino<sup>a,b</sup>, Merche Heras<sup>a,b</sup>, Carme Buixadera<sup>a,b</sup>, Luis Masana<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Vascular Medicine and Metabolism Unit and Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, IISPV, Rovira i Virgili University, 43201 Reus, Spain

<sup>b</sup> Spanish Biomedical Research Network in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 September 2010

Received in revised form 10 January 2011

Accepted 26 January 2011

Available online 2 February 2011

#### Keywords:

HDL

Apolipoprotein A1

Smoking

Peripheral artery tonometry

Reactive hyperaemia

### ABSTRACT

**Objective:** Reactive hyperaemia after shear stress is a surrogate marker of endothelial function. However, the mechanisms controlling the dilation capacity of small peripheral resistance arteries are not well characterised. We evaluated reactive hyperaemia by peripheral artery tonometry (PAT) in the acral arteries and studied their clinical and biochemical determinants.

**Methods:** Eight hundred sixteen subjects at intermediate to high cardiovascular risk were recruited. The reactive hyperaemia index (RHI) of small digital arteries was measured by PAT. Clinical history data, anthropometry and biochemical parameters were also analysed. We studied the associations between clinical and biochemical factors and small artery RHI.

**Results:** HDL cholesterol and apolipoprotein A1 levels were strongly and directly correlated with an increased dilation response. Metabolic syndrome components, such as increased waist circumference, hypertriglyceridaemia and smoking, were inversely associated with RHI as were serum markers of inflammation. The predictors of small peripheral artery RHI were HDL cholesterol, which had a protective effect, and smoking, which had a negative impact.

**Conclusion:** HDL cholesterol and apolipoprotein A1 levels had a strong, positive correlation with small artery reactive hyperaemia, whereas smoking, waist circumference and triglyceride levels were inversely associated. HDL cholesterol was the main determinant of RHI in small peripheral resistance arteries.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The assessment of arterial dynamics is considered a surrogate marker of arteriosclerosis risk [1]. The dilation response of coronary arteries to acetylcholine perfusion is a direct measure of coronary disease, and changes in nitric oxide (NO) production by the endothelium lead to a paradoxical constriction response following acetylcholine perfusion [2]. Non-invasive methods have been developed to assess endothelial function. The flow-mediated dilation (FMD) method at the brachial artery measures the dilation capacity of a medium-sized peripheral artery after an ischaemic period. This post-ischaemic reactivity can be assessed by sonography and is mediated by endothelial production of NO. The FMD method has been used in clinical settings and is considered a valuable tool to evaluate vascular risk [3]. Due to difficulties in the standardisation of this technique in clinical practice, however,

other methods based on distal artery function have been developed. One such method is peripheral artery tonometry (PAT), a reliable approach to analysing arterial dynamics, stiffness and function [4]. Previous studies using PAT have demonstrated high reproducibility and shown a high concordance with FMD of the brachial artery and coronary acetylcholine infusion [5–7]. PAT is based on capturing a real-time, beat-to-beat plethysmographic record of pulse wave amplitude in the digital arteries using pneumatic probes [4]. The reactive hyperaemia index (RHI) measured by peripheral artery tonometry is suggested to depend on NO release and is thus a surrogate marker of endothelial function [8].

The mechanisms controlling vascular tone in large and small arteries, however, are not the same. Small arteries or resistance vessels, e.g., those in the fingertips, regulate organ perfusion and peripheral vascular resistance, and their flow is regulated by both vascular tone and vascular structure, secondary to a variety of local mechanical and biochemical stimuli, along with endocrine and neural influences. Vascular dilation is mainly controlled by NO and other vasodilator and vasoconstrictor substances and is also regulated by sympathetic innervation, at least up to the level of small arteries [9]. The regulation of small peripheral arteries is of paramount importance because these vessels determine peripheral

\* Corresponding author at: Vascular Medicine and Metabolism Unit, Sant Joan University Hospital, Faculty of Medicine, Rovira & Virgili University, C/Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain. Tel.: +34 629486829; fax: +34 977319984.

E-mail address: [rferre@grupsgassa.cat](mailto:rferre@grupsgassa.cat) (R. Ferré).

vascular resistance and organ blood supply. The smooth muscle cell (SMC) content of the vessel wall in small arteries can reach 85%, and SMCs in the vessel wall are aligned circumferentially to provide optimal resistance against vessel distension, unlike large elastic arteries, in which the SMC content is less than 50% [10]. Although NO and the sympathetic nervous system are the primary regulators of arterial dilation, the impact of other metabolic variables has not been clearly established. NO synthesis in endothelial cells is modified by arterial dynamics, inflammation, oxidative stress, lipid profile and other cardiovascular risk factors [11]. These classical cardiovascular risk factors have been associated with impaired endothelial function (EF) in humans, and the cardiovascular event rate of individuals with endothelial dysfunction is increased [12]. Although RHI has been correlated with the Framingham risk score (FRS) and its components in a community-based study [13], the association between classical cardiovascular risk factors, particularly the lipid profile, and the vascular function of small arteries is not established.

While high LDL cholesterol level is associated with endothelial dysfunction, HDLc has been positively associated with arterial dilation capacity as measured by FMD. Low HDLc level predicts worse reactive hyperaemia in the brachial arteries [14], and NO production by nitric oxide synthase is enhanced by the presence of HDL [15]. Whether these observations can be extrapolated to small artery reactivity is unknown.

Because techniques that focus on the assessment of peripheral small artery reactivity are increasingly used to evaluate cardiovascular risk and therapy decision making, it is necessary to define the metabolic factors influencing peripheral artery dynamics. The aim of this study was to assess the correlations between RHI and clinical and biochemical characteristics, focusing on lipid profile, in patients with increased cardiovascular risk.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects and study design

We conducted a cross-sectional, observational study of 816 subjects, including men and women who were 21–83 years of age and had no history of cardiovascular disease patients with previous neoplasm or other severe, chronic diseases were not included. Complete physical, anthropometric, general biochemical and vascular evaluations (consisting of a reactive hyperaemia assessment by peripheral artery tonometry and ankle-brachial index measurement) were performed on the same day. Patients were recruited from the Vascular Medicine and Metabolism Unit of Sant Joan University Hospital, Reus, Spain. The hospital ethics committee approved the study, and all subjects gave written informed consent.

### 2.2. Measurement of peripheral reactive hyperaemia

RHI was measured using an EndoPat-2000 device (Itamar Medical Ltd., Israel). Determinations were performed in a quiet room with controlled temperature (22–24°C) after patients had fasted for 12 h and refrained from smoking or strenuous exercise for 24 h. The patients lay in a relaxed, quiet and evenly illuminated environment, and the device measured changes in pulse waves in the digital arteries. Blood flow measurements from two fingertips, one from each hand (test and control), were compared after a stabilisation period, and a second, comparison pair of measurements was taken before and after five minutes of brachial ischaemia in one arm (the test arm) Table 1. The results were processed by specific software to calculate the post-ischaemia reflex vasodilation observed when measurements from the test arm (before and after ischaemia) were

**Table 1**  
Multivariate analyses of RHI determinants.

Variable	B	95% CI	P
HDL cholesterol	0.143	0.048–0.239	<0.001
Smoking	0.097	0.166–0.028	<0.001
Age	0.207	–0.067–0.219	NS
Gender	0.130	–0.059–0.192	NS
LDL cholesterol	0.051	–0.211–0.109	NS
Triglycerides	0.097	–0.240–0.046	NS
hsCRP	0.016	–0.054–0.021	NS
Systolic blood pressure	0.138	–0.069–0.346	NS
Type 2 diabetes	0.001	–0.008–0.010	NS
Lipid lowering therapy	0.107	0.083–0.131	NS

compared to those from the control arm. The value obtained was termed the RHI.

The variability of this technique in our laboratory was 17%, the intraclass correlation coefficient was 0.52, and the within-subject variation was 0.19. These findings are similar to those described by the manufacturer and in the literature [5,16].

### 2.3. Lipid profile and other biochemical determinations

Cholesterol, triglycerides, glucose, direct LDL and HDL cholesterol, apolipoprotein A1 (apo A1), apolipoprotein B100 (apo B100) and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) levels were measured using enzymatic and turbidimetric assays (Spinreact, SA, Spain) adapted to a Cobas Mira Plus autoanalyser (Roche Diagnostics, Spain). Other biochemical parameters were measured by standard methods.

### 2.4. Statistical analyses

Statistical tests and corresponding *P*-values were calculated as two-sided. In all cases, a *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. SPSS version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses. The normality of all distributions was assessed with the Kolmogorov–Smirnov test. Spearman correlation tests were used to analyse bivariate associations between changes in RHI and changes in other variables. Data from population characteristics are presented as the median ± interquartile range or as frequencies for categorical variables when applicable. The observed differences in variables between groups were analysed using the Mann–Whitney *U* or chi-squared tests, as appropriate. Forward stepwise multiple linear regression analyses were performed to identify variables with a significant independent association with RHI. The final parameters were obtained by introducing the chosen variables into a linear regression analysis. Variables with a high level of association ( $r > 0.700$ ,  $P < 0.05$ ) were not included in the same model. The accepted model was the one with the highest adjusted *R*<sup>2</sup> value and the lowest number of variables included. We report *B* coefficient values and their 95% confidence intervals (Cis).

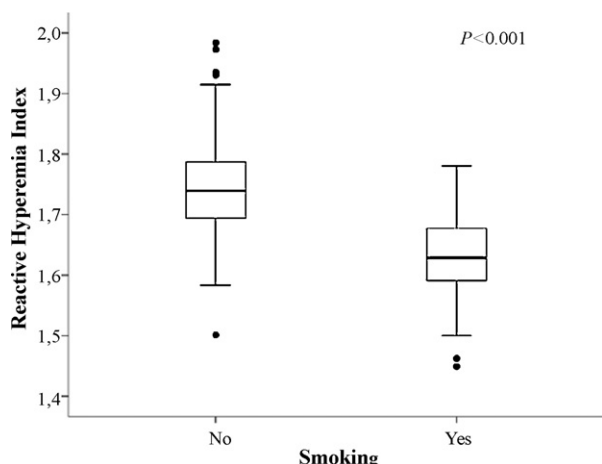
## 3. Results

The demographic, clinical and biochemical characteristics of the participants are shown in Table 2. The median RHI value for the entire population was  $1.711 \pm 0.111$ . Men had a lower median RHI value than women ( $1.69 \pm 0.097$  and  $1.744 \pm 0.103$ , respectively,  $P < 0.0001$ ), and smokers had a lower median RHI value than non-smokers ( $1.628 \pm 0.086$  and  $1.739 \pm 0.092$ , respectively,  $P < 0.0001$ ) [Fig. 1]. In a bivariate correlation analysis, RHI was strongly positively correlated with HDLc ( $r = 0.609$ ,  $P < 0.001$ ) and apo A1 ( $r = 0.423$ ,  $P < 0.001$ ). RHI was also inversely corre-

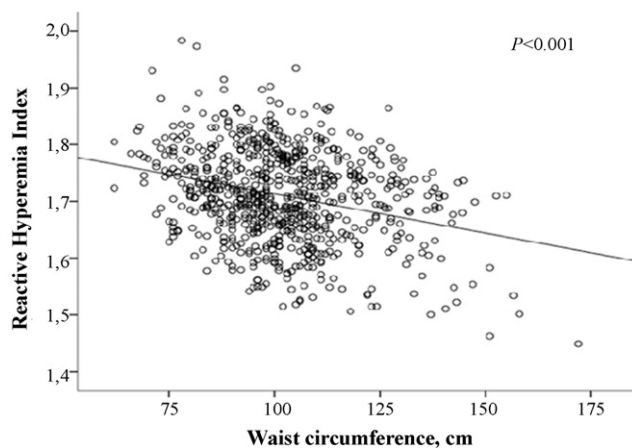
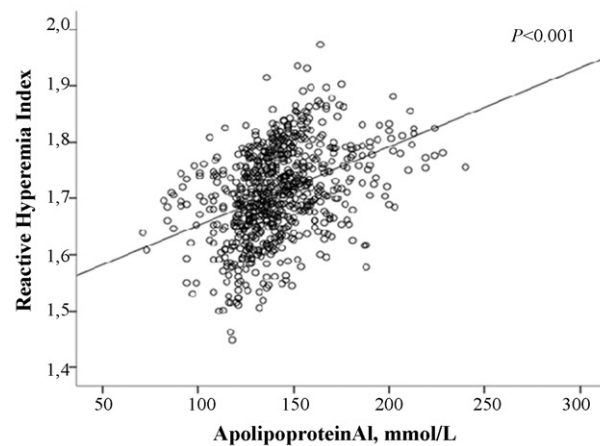
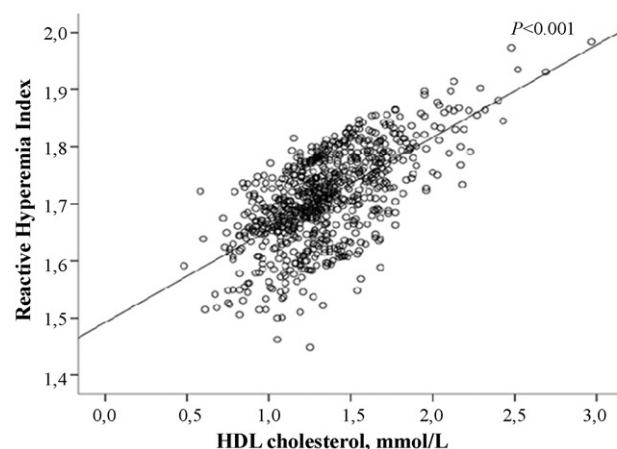
**Table 2**  
General characteristics of the study population (n = 816).

Characteristic	
Gender, %male	57.4
Age (years)	54.5 ± 17
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	30.1 ± 8.8
Waist circumference (cm)	101 ± 20.7
Systolic blood pressure (mmHg)	130 ± 20
Diastolic blood pressure (mmHg)	80 ± 15
No major cardiovascular risk factors (%)	8.5
Type 2 diabetes (%)	27.5
Hypertension (%)	44.1
Smoking (%)	26.6
Metabolic syndrome (%)	41.9
Chronic kidney disease (%)	5.4
Fasting glucose (mmol/L)	5.5 ± 1.6
Total cholesterol (mmol/L)	5.3 ± 2.32
LDL cholesterol (mmol/L)	3.44 ± 2.03
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3 ± 0.4
Non-HDL cholesterol (mmol/L)	3.97 ± 2.27
Triglycerides (mmol/L)	1.6 ± 1.41
Apolipoprotein A1 (mmol/L)	138.5 ± 25.25
Apolipoprotein B100 (mmol/L)	117 ± 47
hsCRP (mg/L)	1.96 ± 3.92
Framingham risk score (%)	9 ± 9
Reactive hyperemia index	1.711 ± 0.111
Lipid lowering therapy/statins (%)	78.4/83.4

lated with waist circumference ( $r = -0.223$ ,  $P < 0.001$ ), triglycerides ( $r = -0.178$ ,  $P < 0.001$ ), hsCRP ( $r = -0.162$ ,  $P < 0.001$ ) and uric acid level ( $r = -0.131$ ,  $P = 0.001$ ) [Fig. 2]. Moreover, HDLc quartiles were related to RHI values: subjects with higher HDLc quartiles had a better artery dilation response, and post hoc analyses showed statistical differences between all quartiles [Fig. 3]. When we investigated the effects of metabolic syndrome (MS) components on RHI, we observed that the presence of at least one component was associated with worse endothelial function (median RHI for subjects without MS components: 1.75, 95% CI 1.73–1.76; median RHI for subjects with one MS component: 1.71, 95% CI 1.69–1.72,  $P = 0.001$ ). We did not find differences when more components were present. These results did not change significantly when the population was segregated by gender, smoking status, lipid-lowering therapy prescription or diagnosis of hypertension or diabetes mellitus. In multivariate analyses to investigate predictors of RHI, we found that HDLc was the main determinant of artery reflex dilation capacity and that it had a protective effect, whereas smoking had the largest negative impact.



**Fig. 1.** Box-plot of RHI values and their association with smoking (n = 217).



**Fig. 2.** Significant correlations between RHI and waist circumference, HDLc and apo A1.

#### 4. Discussion

This study shows strong, direct correlations between HDLc and apo A1 levels and small artery dilation capacity after induced ischaemia. To our knowledge, this is the largest series of patients with dyslipidaemia and elevated cardiovascular risk in which small artery reactivity has been assessed by peripheral artery tonometry. Small arteries are responsible for vascular resistance and organ perfusion; therefore, the factors influencing vascular reactivity are of interest in clinical practice. In humans, HDLc level has been associated with NO-dependent coronary vasodilation [17] and is an independent predictor of NO-dependent peripheral vasodilation

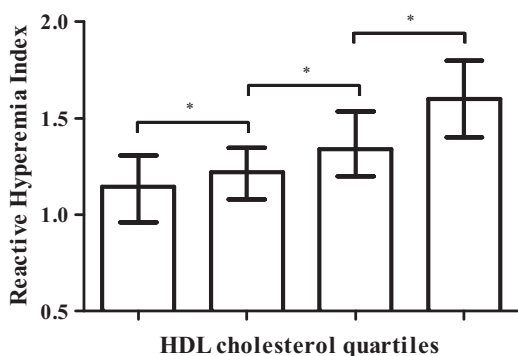


Fig. 3. Differences between HDLc quartiles according to RHI value \* $P < 0.0001$

as assessed by FMD in healthy individuals [14], hyperlipidaemic and diabetic patients [18,19] and patients with coronary artery disease [20]. Although HDL cholesterol has been associated with arterial dilation in large arteries, there is no clinical evidence for such an association in small arteries. PAT evaluates small artery relaxation after shear stress and has shown good correlation with FMD, even with coronary acetylcholine infusion. These techniques, however, are focused on large or medium-sized arteries. HDL particles have protective effects on endothelium by several mechanisms, such as stimulating the activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to increase production of the vasodilator NO, promoting the abundance of eNOS and prolonging its half-life and activity [21]. Independent mechanisms are secondary to an increase in the intracellular calcium concentration, which regulates eNOS activity [22].

Given that reactive hyperaemia as measured by peripheral artery tonometry in acral arteries is NO-dependent, we suggest that the strong association between HDLc level and RHI was due to a direct effect of HDL particles on NO production and release.

We also found that waist circumference and triglyceride level were associated with RHI, although the correlations were weaker. The strong association between central obesity, hypertriglyceridaemia and low HDL is well known, and these factors define the MS, a condition that increases the risk for vascular diseases. Our results show that among the metabolic alterations mentioned above, low HDL is a key factor in determining endothelial dysfunction. The association between HDLc and RHI was maintained after adjusting for waist circumference and triglyceride level, and HDL, but not waist circumference or triglycerides, was a determinant of RHI in the multivariate analysis. Surprisingly, we did not observe worse RHI values when more than one MS component was present. These data suggest that HDL abnormalities could be the primary lipid determinant of peripheral artery reactivity in the MS.

Smoking was the main environmental factor that worsened small artery dilation after induced ischaemia. Tobacco has many deleterious effects on the endothelium, including impairment of macrovascular vasodilator function, such as in the coronary and brachial arteries and in microvascular beds, secondary to decreased NO availability by altering the expression and activity of eNOS. Furthermore, smoking is related to inflammation, causing a 20–25% increase in the peripheral blood leukocyte count and increased C-reactive protein. Smoking is also associated with low HDL. The mechanism behind this effect is not well understood, but it is thought to involve different metabolic pathway alterations. Tobacco induces insulin resistance, which leads to reduced lipoprotein lipase activity, and smoking directly alters other key proteins in HDL metabolism, e.g., lecithin cholesterol acyl-transferase, cholesterol ester transfer protein and hepatic lipase, leading to decreased HDL level [23,24]. In the present study, however, the effect of HDL

on RHI was independent of the effect of tobacco, and inversely, the impact of smoking on RHI was not associated with low HDLc.

Notably, the association between HDLc level and reactive hyperaemia was also present when we segregated subjects on the basis of diabetes mellitus, hypertension, and normal or abnormal lipid profile or lipid-lowering therapy. These conditions did not alter our results, suggesting that the observed relationship was not biased by disease status. Currently, given that the importance of HDL as a therapeutic target is under debate, our data reinforce the role of HDL as a protector of arterial dynamics.

## 5. Study limitations

The main limitation of our work was that patients included in the study were under treatment for their cardiovascular risk factors. Statins and renin-angiotensin inhibitors improve endothelial function. Therefore, we investigated the effect of these therapies on RHI and did not find any statistical significance differences between patients with and without these treatments (data not shown). Second, the participants were from an outpatient cardiovascular risk clinic, so our results may not be extrapolated to the general population. Finally, RHI is an index of real-time vascular function. Although patients were advised to follow the conditions described in the Section 2, vascular function could have been modified by factors beyond our control.

## 6. Conclusions

HDL cholesterol and apolipoprotein A1 levels had a strong, positive correlation with small artery reactive hyperaemia as measured by PAT. HDL cholesterol was the main determinant of RHI in a population with increased cardiovascular risk, and smoking, waist circumference and triglyceride level were inversely associated with RHI. RHI is a surrogate marker of endothelial function in small artery beds and is improved by increased HDLc level. It is likely that this effect is mediated by NO release promoted by HDL particles and the actions of NO on smooth muscle cells in small acral resistance arteries. This is the first study to show that HDL cholesterol is associated with reactive hyperaemia in small peripheral artery beds.

## References

- [1] Giannotti G, Landmesser U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz* 2007;32:568–72.
- [2] Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 2008;40:180–96.
- [3] Faulx MD, Wright AT, Hoit BD. Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. *Am Heart J* 2003;145:943–51.
- [4] Hamburg NM, Benjamin EJ. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19:6–11.
- [5] Reisner Y, Lusky R, Shay-El Y, Schnall R, Herscovici S. Reproducibility of endothelial function and arterial stiffness assessed using finger peripheral arterial tonometry. *EHJ* 2007;28:484.
- [6] Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146:168–74.
- [7] Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes Jr DR, Kuvin JT, Lerman A. Non-invasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *JACC* 2004;44:2137–41.
- [8] Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. The role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* 2006;101:545–8.
- [9] van den Akker J, Schoorl MJ, Bakker EN, Vanbavel E. Small artery remodeling current concepts and questions. *J Vasc Res* 2010;47:183–202.
- [10] Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 1990;70:921–61.
- [11] Hirata K, Miki N, Kuroda Y, Sakoda T, Kawashima S, Yokoyama M. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 1995;76:958–62.



- [12] O'Keefe JH, Carter MD, Lavie CJ. Primary and secondary prevention of cardiovascular diseases: a practical evidence-based approach. *Mayo Clin Proc* 2009;84:741–57.
- [13] Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham heart study. *Circulation* 2008;117:2467–74.
- [14] Kuvin JT, Patel AR, Sidhu M, et al. Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function. *Am J Cardiol* 2003;92:275–9.
- [15] Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006;98:1352–64.
- [16] Liu J, Wang J, Jin Y, Roethig HJ, Unverdorben M. Variability of peripheral arterial tonometry in the measurement of endothelial function in healthy men. *Clin Cardiol* 2009;32:700–4.
- [17] Natarajan P, Ray KK, Cannon CP. High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1283–99.
- [18] Lupattelli G, Marchesi S, Roscini AR, et al. Direct association between high-density lipoprotein cholesterol and endothelial function in hyperlipemia. *Am J Cardiol* 2002;90:648–50.
- [19] O'Brien SF, Watts GF, Playford DA, Burke V, O'Neal DN, Best JD. Low-density lipoprotein size, high-density lipoprotein concentration, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med* 1997;14:974–8.
- [20] Zhang X, Zhao SP, Li XP, Gao M, Zhou QC. Endothelium-dependent and -independent functions are impaired in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000;149:19–24.
- [21] Rämet ME, Rämet M, Lu Q, et al. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2288–97.
- [22] Nofer JR, van der Giet M, Tölle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor SIP3. *J Clin Invest* 2004;113:569–81.
- [23] Reaven G, Tsao PS. Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: the key player between cigarette smoking and cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol* 2003;19:1044–7.
- [24] Campbell SC, Moffatt RJ, Stamford BA. Smoking and smoking cessation—the relationship between cardiovascular disease and lipoprotein metabolism: a review. *Atherosclerosis* 2008;201:225–35.



## 7.2. Estudi B

**Títol:** La rigidesa arterial mesurada per l'índex d'augment és un determinant del gruix íntima-mitja carotídi en pacients amb risc cardiovascular moderat.

**Objectiu:** La rigidesa arterial valorada per l'índex d'augment i el gruix íntima-mitja carotídi estan relacionats amb els esdeveniments cardiovasculars. La relació entre aquests dos marcadors d'arteriosclerosi no és ben coneguda. L'objectiu de l'estudi es basa en determinar la relació entre l'índex d'augment i el gruix íntima-mitja carotídi en pacients amb risc cardiovascular moderat.

**Mètodes:** Es varen incloure 816 voluntaris de la consulta de la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme. L'índex d'augment es determinà per tonometria arterial perifèrica a nivell digital i el gruix íntima-mitja carotídi per ecografia carotídia. L'índex d'augment es va ajustar a 75 pulsacions per minut.

**Resultats:** Els pacients amb diabetis mellitus tipus 2 o/i hipertensió arterial mostraren major rigidesa arterial central que els controls. L'índex d'augment presentà una correlació positiva amb el gruix íntima-mitja en la totalitat de la població estudiada, de major magnitud en aquells individus amb hipertensió arterial, dislipèmia i síndrome metabòlica i en menor importància en presència de diabetis mellitus tipus 2. L'índex d'augment fou un dels principals determinants del gruix íntima-mitja a més de l'edat, el sexe masculí, el colesterol LDL i la pressió arterial sistòlica.

**Conclusions:** L'índex d'augment i el gruix íntima-mitja carotídi mostren una correlació directe en pacients amb risc cardiovascular moderat. L'índex d'augment és un dels principals predictors del gruix íntima-mitja pel que podria ser considerat un marcador de risc cardiovascular més enllà dels factors de risc clàssics.

## **La rigidesa aòrtica és un determinant del gruix íntima-mitja carotidi en pacients amb risc cardiovascular moderat**

### Introducció:

El gruix íntima mitja carotidi és un estudi morfològic arterial i un marcador indirecte d'arteriosclerosi. Es relaciona directament amb els factors de risc CV, és un predictor tan d'ictus com de cardiopatia isquèmica i un dels objectius d'assaig de tractaments per l'arteriosclerosi i els seus factors de risc. La seva regressió s'ha associat a una major supervivència cardiovascular.

La rigidesa vascular és una mesura del comportament funcional de les artèries. Es relaciona amb els futurs esdeveniments cardiovasculars i amb alguns factors de risc, sobretot amb la hipertensió arterial. S'ha proposat com una de les alteracions arterials inicials en el procés arterioscleròtic, tal com passa també amb la disfunció endotel·lial. Alguns fàrmacs redueixen la rigidesa arterial central, com els antagonistes del calci i els inhibidors del sistema renina-angiotensina, en algun cas això s'ha vist relacionat amb una major supervivència cardiovascular.

La població amb risc cardiovascular moderat és la que pot beneficiar-se més del cribatge d'arteriosclerosi subclínica per tal de decidir intensificar o iniciar un tractament farmacològic, implementar els canvis terapèutics de l'estil de vida o estratificar de nou aquest risc a baix o alt.

Si bé tan el gruix íntima-mitja carotidi com la rigidesa arterial poden tenir una patogènia similar, la seva relació en pacients amb diversos factors de risc cardiovascular no és ben coneguda.

Objectiu:

Determinar la relació entre la rigidesa arterial central mesurada per l'índex d'augment i el gruix íntima mitja carotí de pacients amb risc cardiovascular moderat.

Mètodes:

Població estudiada i disseny

Estudi transversal i observacional de 816 individus, homes i dones de 21 a 83 anys d'edat sense malaltia cardiovascular prèvia ni evidència clínica de neoplàsies o altres malalties cròniques severes. Es realitzà entrevista clínica amb anamnesi, exploració física completa, determinació analítica, mesura de rigidesa arterial i GIMc el mateix dia. Els pacients es van obtenir de la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme de l'Hospital Sant Joan de Reus. L'estudi s'aprovà pel Comitè d'Ètica i Investigació Clínica de l'hospital i tots els participants van signar el consentiment informat.

Mesura de la rigidesa arterial:

L'índex d'augment (AIx) es mesurà per anàlisi de la ona de pols a nivell d'artèries digitals per tonometria arterial perifèrica mitjançant l'aparell EndoPAT-2000 (Itamar Medical Ltd., Israel). La determinació es realitzà en un ambient tranquil, a temperatura controlada entre 22-24 °C i amb els pacients en dejú de 12 hores, es recomanà als pacients no haver fumats ni haver fet exercici extenuant. L'índex d'augment es va ajustar a 75 batecs per minut (AIx@75)

#### Mesura del gruix íntima-mitja carotidi:

Per la mesura del GIMc es va fer servir un equip d'ecografia Acuson Sequoia (Siemens Medical Solutions, Alemanya) equipat amb una sonda lineal (8L5 5-12 Mhz). Es mesuraren ambdós caròtides comuns, les bifurcacions o bulbs i les caròtides internes. Els resultats es van expressar com la mitjana i el màxim de les 6 determinacions o bé mitjana i màxim de les caròtides comuns.

#### Determinacions bioquímiques:

El colesterol total, els triglicèrids, la glucosa, el colesterol LDL, HDL, apolipoproteïna B100 i PCRus es van determinar per assajos enzimàtics i turbidimètrics (Spinreact S.A., Espanya) adaptats a l'auto analitzador Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, Espanya).

#### Anàlisi estadística:

Les dades antropomètriques, bioquímiques i vasculars s'expressen com mitjana  $\pm$ desviació estàndard o medianes i rang inter quartil per les variables contínues o freqüències per les variables categòriques. Les diferències entre grups es van determinar per ANOVA o Kruskal-Wallis per les variables contínues o pel test de Chi quadrat per les categòriques. El test univariant es va fer servir per buscar les associacions de Alx@75 amb les dades antropomètriques, bioquímiques i vasculars. L'anàlisi multivariant stepwise es va utilitzar per avaluar els determinants de GIMc i Alx@75. S'acceptaren valors significatius aquells amb  $P \leq 0.005$ . Pel càlcul estadístic es va fer servir el programa SPSS versió 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

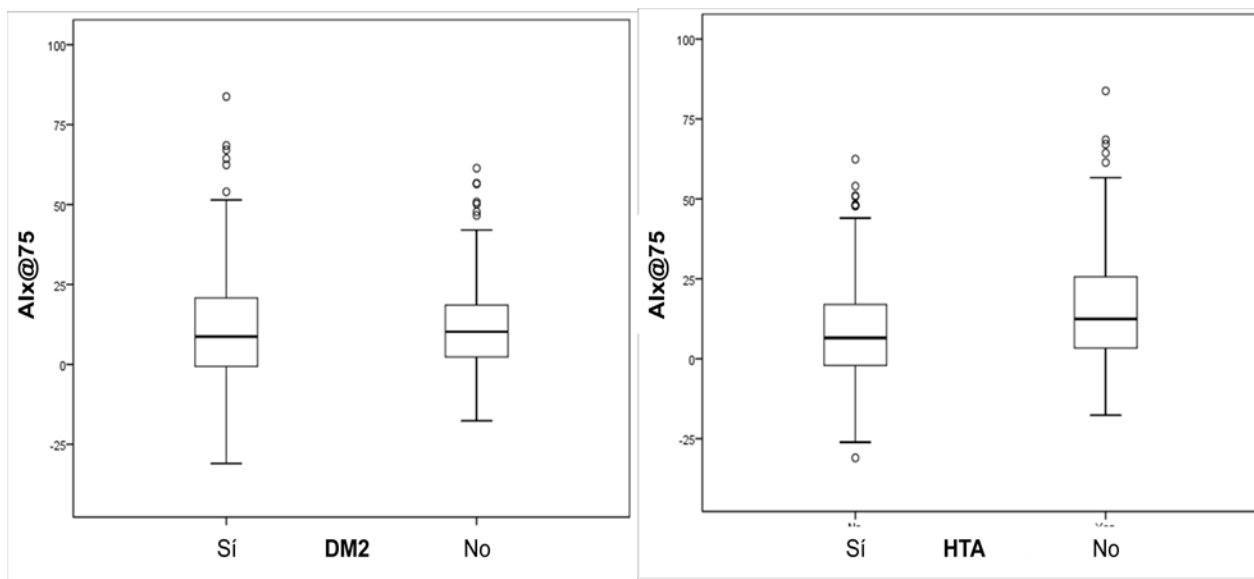
Resultats:

Les característiques clíniques i analítiques dels pacients es mostren a la Taula 2. L'edat mitjana va ser de 54.5 anys, el GIMc mig de  $0.76 \pm 0.16$  mm en dones i  $0.80 \pm 0.16$  en homes ( $P=0.001$ ) i l'Aix@75 de  $13.7 \pm 16.1$  en dones i  $10.2 \pm 16.1$  en homes ( $P=0.003$ ).

**Taula 2. Característiques generals de la població (n=816)**

Gènere Home, %	57.4
Edat, anys	$54.5 \pm 17$
IMC, $\text{kg/m}^2$	$30.1 \pm 8.8$
Pabd, cm	$101 \pm 20.7$
PAS, mmHg	$130 \pm 20$
PAD, mmHg	$80 \pm 15$
DM2, %	27.5
HTA, %	44.1
Tabaquisme, %	26.6
Síndrome metabòlica, %	41.9
IRC, %	5.4
Glucosa, mmol/L	$5.5 \pm 1.6$
Colesterol total, mmol/L	$5.3 \pm 2.32$
Colesterol LDL, mmol/L	$3.44 \pm 2.03$
Colesterol HDL, mmol/L	$1.3 \pm 0.4$
Triglicèrids, mmol/L	$1.6 \pm 1.41$
PCRus, mg/L	$1.96 \pm 3.92$
Framingham risk score, %	9 $\pm$ 9
AIX@75	$11.7 \pm 16.2$
IMT mitjana	$0.79 \pm 0.16$

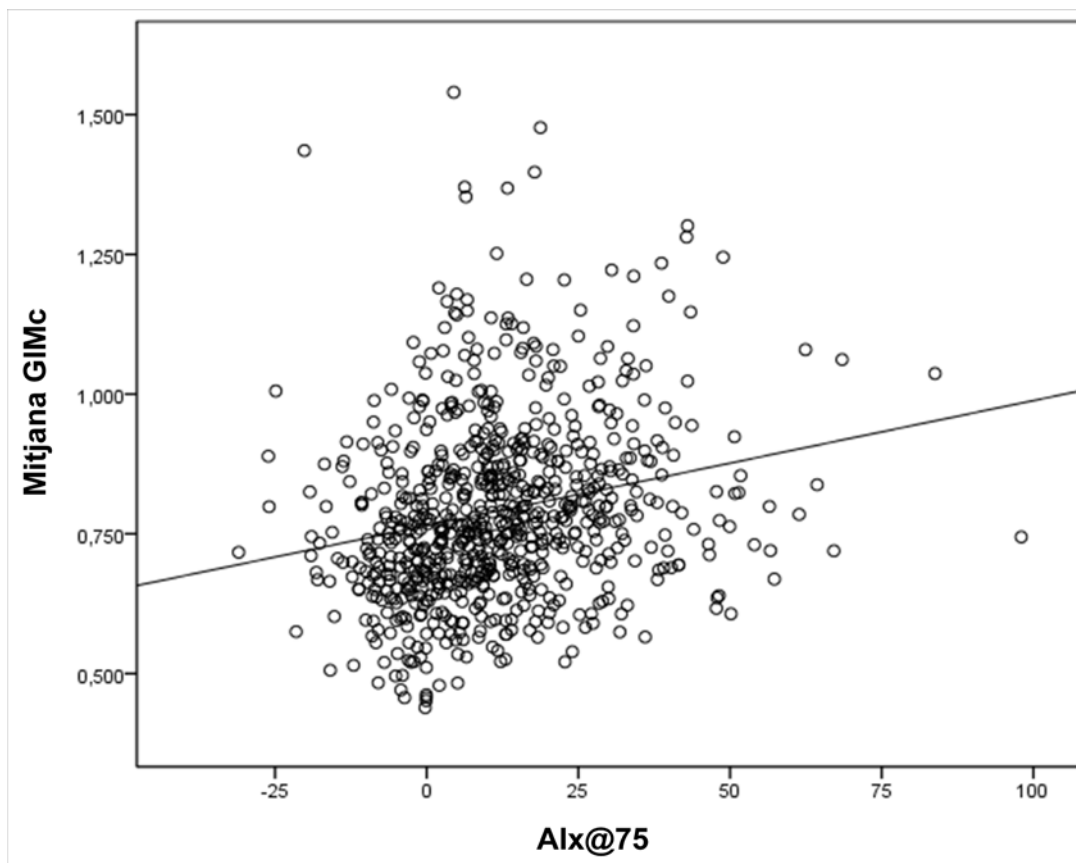
S'observaren diferències de l'IAx@75 entre els individus amb DM2 i els que no en presentaren, mediana 10.1%, rang inter quartil: 16.2 contra 8.71%, rang inter quartil :21.5,  $P=0.001$ , i per aquells pacients amb hipertensió arterial, mediana 12.4%, rang inter quartil: 22.2 contra 6.5% i 19.1,  $P<0.0001$ . Figures...



**Figura 14.** *Box-plot* de les diferències en l'IAx@75 en els individus amb diabetis mellitus tipus 2 o hipertensió arterial.



A l'explorar les correlacions entre Alx@75 i els altres paràmetres s'observà una correlació directa i significativa entre Alx@75 i el GIMc, ( $r=0.32, P<0.0001$ ).



**Figura 15.** Correlació entre l'Alx@75 i el gruix íntima-mitja carotídi.

Aquesta correlació va ser més forta en aquells pacients amb hipertensió arterial ( $n= 364$ ), dislipèmia ( $n=543$ ) o síndrome metabòlica ( $n= 543$ ),  $r=0.17$  i  $P=0.004$ ,  $r=0.21$  i  $P=0.001$ ,  $r=0.27$  i  $P<0.0001$  respectivament però no es va observar en aquells individus amb DM2 ( $n=224$ ).

En l'anàlisi multivariant , l'Alx@75 va ser un dels principals determinants del GIMc ( $B=0.016, P<0.001$ ) juntament amb el sexe masculí, l'edat, els nivells de colesterol LDL i la pressió arterial sistòlica. A l'analitzar els subgrups, en aquells pacients diagnosticats d'hipertensió arterial o síndrome metabòlica els determinants foren l'Alx@75, l'edat, el sexe masculí i la PCRus, mentre que en el grup amb dislipèmia ho van ser l'Alx@75, l'edat, el sexe masculí i els nivells de colesterol LDL.

**Taula 3. Determinants del gruix íntima-mitja carotídi en la totalitat de la població estudiada.**

<b>Variable</b>	<b>B</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
Alx@75	0.566	.15-.95	.004
Edat	0.597	.5-.68	<.001
PAS	0.102	.04-.16	.001
LDLc	0.697	.12-1.2	.017
Gènere ♂	2.387	.7-4.8	.05

### Discussió:

Aquest treball descriu la relació entre dos paràmetres d'arteriosclerosi subclínica, un de funcional, l'Alx@75, que fa referència a la rigidesa central, sobretot aòrtica, i un de morfològic, el GIMc. Si bé totes dues determinacions es poden observar en el procés arterioscleròtic i comparteixen alguns dels mecanismes patogènics, la seva associació no ha estat massa estudiada. En el present estudi es troba una bona correlació positiva entre un i l'altre, per tan, els pacients inclosos en aquest treball sovint les presenten alhora. La població de l'estudi consisteix en una mostra de persones amb risc CV moderat i que per tan o bé presenten 2 o més factors de risc CV o bé en tenen un de sol però de grau sever, com per exemple una hipercolesterolèmia genètica. Els pacients amb HTA i els que tenen DM2 tenen una Alx@75 més elevat que els demés, per tan, major rigidesa arterial central. El fet que els individus amb dislipèmia no mostrin una major rigidesa pot ser degut tan al tractament amb estatines com a la càrrega de tractament hipolipemiant, ja que la nostra unitat és especialitzada en la dislipèmia genètica i aquest pacients ja fa molt temps que reben tractament amb fàrmacs hipolipemiant a dosis adequades per assolir els objectius terapèutics o bé amb les dosis màximes tolerades. Per altra banda, s'ha de remarcar també, que els participants estaven amb el seu tractament habitual quan es van fer les proves tan de rigidesa arterial com de GIMc, i que aquest tractament pot haver influït en el resultat d'Alx@75, sobretot pel que fa a les estatines, antagonistes del calci i inhibidors del sistema renina-angiotensina, dels que està ben descrita la seva influència sobre la rigidesa arterial. L'Alx@75 es mostra com un determinant del GIMc en la totalitat de la població, juntament amb d'altres factors de risc clàssics, tot i en l'anàlisi multivariant quan s'hi afegeixen possibles factors de confusió. Aquest fet dóna a entendre que la rigidesa arterial pot aparèixer abans o bé ser un factor que predisposa a la formació de l'aterosclerosi a nivell carotídi. Aquesta troballa pot tenir repercussions futures en el tractament de l'aterosclerosi.

Els pacients amb DM2 són dels que tenen un  $Alx@75$  més elevat, però per contra, en aquesta població no existeix una correlació positiva entre la rigidesa arterial i el GIMc, això es podria explicar perquè aquests pacients són tractats més intensament, la major part d'ells porten estatines i un inhibidor del sistema renina-angiotensina, fàrmacs que s'ha demostrat que alenteixen la progressió de la placa d'ateroma. Per altra banda, si es troba relació d' $Alx@75$  i GIMc en l'estat de prediabetis, en aquest cas definit com síndrome metabòlica.

### Conclusions:

La rigidesa arterial central mesurada per  $Alx@75$  i el GIMc mostren una correlació directa en pacients amb risc CV moderat. L' $Alx@75$  és un determinant de l'aterosclerosi carotídia. La rigidesa arterial central definida per  $Alx@75$  es podria considerar un marcador de malaltia cardiovascular més enllà dels factors de risc clàssics.

### 7.3. Estudi C

*Títol: Heterozygous familial hypercholesterolaemic patients have increased arterial stiffness, as determined with the augmentation index.*

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2011. En premsa.

**Objectiu:** En la hipercolesterolèmia familiar, l'estudi de la paret arterial i la seva funció tenen un especial interès. La rigidesa arterial està relacionada amb la malaltia cardiovascular. En aquest estudi s'examina la rigidesa arterial en pacients amb hipercolesterolèmia familiar i la seva associació amb paràmetres vasculars i bioquímics.

**Mètodes:** En aquest estudi transversal es van incloure 125 pacients amb hipercolesterolèmia familiar i 59 controls sans segons edat i sexe. Es van obtenir les dades clíniques, antropomètriques i bioquímiques. L'índex d'augment es determinà per tonometria arterial perifèrica, el gruix íntima-mitja carotídi per ecografia carotídia i també es valorà l'arteriopatia perifèrica per l'índex turmell-braç.

**Resultats:** Els pacients amb hipercolesterolèmia familiar presentaren un índex d'augment més elevat de forma significativa respecte els individus control. No s'observaren diferències en les mesures de l'índex turmell-braç. Els valors de l'índex d'augment es correlacionaren de forma directa amb els nivells de colesterol LDL, la apolipoproteïna B100, el colesterol no-HDL, els triglicèrids i els nivells de selectina-E. Els determinants de l'índex d'augment foren les partícules riques en apolipoproteïna B100, la pressió arterial sistòlica i els nivells de glucosa en sèrum. Finalment, l'índex d'augment ajustat a 75 pulsacions per minut es mostrà com un determinant independent del gruix íntima-mitja carotídi.

Conclusions: Els pacients amb hipercolesterolèmia familiar tenen una rigidesa arterial augmentada tot i els avenços en el maneig clínic. L'índex d'augment està clarament associat a la concentració d'apoliproteïna B100 i és un determinant del gruix íntima-mitja carotídi. L'índex d'augment pot ser utilitzat com a marcador de risc vascular en la hipercolesterolèmia familiar.

## Original Article

# Heterozygous Familial Hypercholesterolaemic Patients Have Increased Arterial Stiffness, as Determined using the Augmentation Index

N Plana, R Ferré, J Merino, G Aragonès, J Girona, M Heras, and L Masana

Vascular Medicine and Metabolism Unit  
Lipids and Atherosclerosis Research Unit  
Sant Joan University Hospital  
Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, IISPV  
Faculty of Medicine, Rovira i Virgili University  
Spanish Biomedical Research Network in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain

**Background:** In heterozygous familial hypercholesterolaemic (FH) patients, study of the arterial wall and its function are of particular interest. Arterial stiffness has been shown to be associated with increased cardiovascular risk (CVR). In this study, we examined arterial stiffness in FH patients and its association with biochemical and vascular parameters.

**Methods and Results:** In this cross-sectional study, we included 125 FH patients (20-60 years old) and 59 gender- and age-matched healthy controls (CG). Clinical, anthropometry and biochemical data were obtained. Arterial stiffness determined based on the augmentation index (AIx) was assessed with peripheral artery tonometry. Carotid intima-media thickness (cIMT) and ankle-brachial index (ABI) were also assessed. FH patients displayed a significant increase in AIx with respect to CG subjects ( $9.6 \pm 17.2$  vs.  $2.6 \pm 10.3\%$ ,  $P=0.011$ ). FH patients also had a thicker cIMT ( $0.758 \pm 0.280$  vs.  $0.635 \pm 0.160$  mm,  $P<0.001$ ), while their ABIs were not different from CG subjects. AIx values were positively correlated with LDLc, non-HDLc, apolipoprotein B100, triglyceride and sE-selectin levels. Moreover, apolipoprotein B100-rich particles, along with systolic blood pressure and glucose levels, were the main determinants of AIx. In addition, we found that AIx ( $\beta=0.224$ ,  $P=0.014$ ) was an independent determinant of cIMT.

**Conclusions:** FH patients have increased arterial stiffness, despite advancements in typical clinical management. AIx is clearly associated with apolipoprotein B100 concentrations, and it is a determinant of cIMT. AIx can be utilised as a vascular risk marker in FH patients.

*J Atheroscler Thromb, 2011; 18:000-000.*

**Key words;** Arterial stiffness, Heterozygous familial hypercholesterolaemia, Augmentation index, Apolipoprotein B100, Intimae-media thickness

## Introduction

Heterozygous familial hypercholesterolaemia (FH) is characterised by an accelerated atherosclerosis

Address for correspondence: Raimon Ferré, Vascular Medicine and Metabolism Unit, Lipids and Atherosclerosis Research Unit, Sant Joan University Hospital, IISPV, Faculty of Medicine, Rovira & Virgili University C/ Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain.  
E-mail: rferre@grupsagessa.cat  
Received: June 22, 2011  
Accepted for publication: July 21, 2011

process. In the pre-statin era, approximately 50% of FH subjects developed a coronary problem before the age of 60<sup>1-2</sup>. Currently, adequate treatment of hypercholesterolaemia has reduced the incidence of arterial problems to almost the same rate as that of the general population<sup>3-4</sup>.

In FH patients, study of the arterial walls and their function is of particular interest. The presence of peripheral artery disease based on an abnormal ankle-brachial index (ABI), or subclinical atherosclerosis, based on incremented carotid intima-media thickness

(cIMT), is considered to be an additional risk factor that requires more aggressive treatment<sup>5-6</sup>). Endothelial dysfunction is considered to be the earliest alteration of the arteries that leads to atherosclerosis. A previous study has already shown that endothelial function is abnormal from childhood in FH patients, while other subclinical atherosclerosis parameters remain normal<sup>7</sup>). Another vascular alteration that precedes atherosclerosis is increased rigidity of the arterial wall<sup>8</sup>). Several indices have been developed to assess arterial stiffness, including aortic pulse wave velocity and the augmentation index (AIx)<sup>9-10</sup>). AIx is defined as an increment in pressure after the first systolic shoulder to the peak of aortic pressure, and is expressed as a percentage of aortic pulse pressure<sup>8</sup>). AIx is associated with several cardiovascular risk factors, including age, hypertension, diabetes, hyperhomocysteinaemia and cigarette smoking<sup>11</sup>). In the Framingham cohort, arterial stiffness (assessed by pulse wave velocity) was associated with an increased risk for developing a first cardiovascular event, thereby improving the risk prediction of classical risk factors<sup>12</sup>).

The association between arterial stiffness and dyslipidaemia in general or hypercholesterolaemia in particular is less well understood, and the existing data are scarce and conflicting<sup>13-15</sup>). Although an increased AIx has been shown to be associated with hypercholesterolaemia, its independent role in arterial wall elasticity has not yet been established. In this study, we examined arterial stiffness by AIx and its association with other subclinical arteriosclerosis parameters in a group of adult FH patients controlled in a specialised vascular medicine and metabolism unit.

## Methods

### Study Patients

A total of 125 male and female (20-60 y) FH patients from the Vascular Medicine and Metabolism Unit of University Hospital Sant Joan in Reus, Spain were included in the study. Fifty-nine age- and gender-matched healthy volunteer subjects were used as the control group (CG), and the same procedures were performed on these individuals. The FH diagnosis was established with a genetic test ( $n=89$ ) or was based on the MedPed clinical criteria ( $n=34$ )<sup>16</sup>). Patients with previous cardiovascular disease, neoplasm antecedents or other severe chronic disease were not included. All patients received statin treatment for a mean of  $8 \pm 4$  years. A wash-out of statin therapy for 4 or 6 weeks in the case of fibrates was performed before the recruitment visit. Lipid-lowering therapy consisted in 66.6% of patients under statin monotherapy and

33.4% in combination with ezetimibe. Most patients were taking atorvastatin (82%), whereas 14% of the study group were taking simvastatin; the rest of the treatment consisted of fluvastatin and pravastatin. Statin doses were prescribed in order to achieve the LDL goals or when higher doses were well tolerated. A complete clinical history focusing on familial antecedents with hypercholesterolaemia and cardiovascular disease, the presence of other cardiovascular risk factors, medication and a complete physical examination including anthropometry data were performed/obtained at the recruiting visit. Biochemical and vascular studies, as itemised below, were also performed.

### Arterial Function Measurements

Arterial stiffness was measured by the AIx using PAT technology (Endo-PAT 2000; Itamar Medical Ltd., Israel). Patients were in a fasting state and had refrained from smoking or strenuous exercise in the previous 12 h. The test was performed in a quiet room at 22-24°C. To perform the measurements, two probes that detect pulse wave amplitude were placed on a finger on both hands. After a stabilisation period, a five-minute period of ischaemia was induced by inflating a blood pressure cuff in one arm. The software then calculated AIx by analysing the differences in pulse wave amplitude before and after ischaemia in comparison to the control arm. We then calculated the AIx adjusted to 75 beats per minute variable (AIx@75).

### Intima-Media Thickness Determination

An Accuson Sequoia sonograph (Siemens Medical Solutions, Germany) equipped with a linear array ultrasound probe (8L5 5-12 MHz small parts broadband transducer) was used for cIMT measurement of the right and left common carotid arteries (CCAs), carotid bifurcations (CBs) and internal carotid arteries (ICAs)<sup>17</sup>). The mean and maximum of these six determinations defined the cIMT mean and cIMT maximum.

### Ankle-Brachial Index Determination

ABI was assessed by measuring radial artery systolic pressure in both arms and at the posterior tibial and peroneal artery in both legs in the supine position using an 8 MHz continuous wave Doppler probe (Hadeco Mini Doppler Es 100X). The ratio of ankle/arm systolic blood pressure was calculated using the lowest value for analysis.

### Biochemical Determinations

Total cholesterol, triglyceride, glucose, direct LDLc, HDLc, apolipoprotein B100, lipoprotein (a)



**Table 1.** Demographic, anthropometric, biochemical and vascular data for each study group

	FH group (n = 125)	Control Group (n = 59)	p-value between groups
Age, years	45 ± 13	47 ± 10	0.303
Gender (% men)	48.8	42.4	0.433
Waist circumference (cm)	88 ± 12	85 ± 9	0.119
Smokers (%)	32	*	
Systolic blood pressure (mmHg) <sup>3</sup>	120 ± 19	115 ± 23	<0.001
Diastolic blood pressure (mmHg) <sup>3</sup>	77 ± 9	75 ± 8	0.403
Hypertensive (%)	12	*	
Type 2 diabetes mellitus (%)	1.6	*	
Glucose (mmol L <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	4.90 ± 0.70	4.90 ± 0.65	0.520
Total cholesterol (mmol L <sup>-1</sup> )	9.1 ± 1.73	4.91 ± 0.88	<0.001
LDLc (mmol L <sup>-1</sup> )	7.32 ± 1.64	3.19 ± 0.74	<0.001
HDLc (mmol L <sup>-1</sup> )	1.29 ± 0.34	1.38 ± 0.42	0.140
Triglyceride (mmol L <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	0.90 ± 0.70	0.60 ± 0.50	0.003
Apolipoprotein B100 (mmol L <sup>-1</sup> )	1.85 ± 0.37	0.95 ± 0.21	<0.001
Lipoprotein (a) (mg/dl) <sup>3</sup>	30.10 ± 21.16	6.40 ± 3.78	<0.001
Hs-CRP (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	1.61 ± 3.50	1.54 ± 2.15	0.826
sE-Selectin (ng/ml)	33.57 ± 12.25	27.71 ± 11.73	0.005
sICAM-1 (ng/ml)	206.59 ± 62.31	201.94 ± 56.73	0.639
Augmentation Index (%)	9.6 ± 17.2	2.6 ± 10.3	0.011
Augmentation Index @75 (%)	9.8 ± 18.3	2.4 ± 11.1	0.011
CCA mean (mm) <sup>3</sup>	0.659 ± 0.209	0.641 ± 0.155	0.376
CCA max (mm) <sup>3</sup>	0.886 ± 0.191	0.701 ± 0.131	<0.001
IMT mean (mm) <sup>3</sup>	0.758 ± 0.280	0.635 ± 0.16	<0.001
IMT maximum (mm) <sup>3</sup>	1.224 ± 0.661	0.781 ± 0.159	<0.001
ABI	1.04 ± 0.09	1.06 ± 0.09	0.248

sICAM-1, Soluble Inter Cellular Adhesion Molecule 1; CCA mean/max, Common Carotid Artery mean and maximum; IMT mean/max, Intima-media thickness mean and maximum; ABI, Ankle-brachial index.

Values are given as percentages of patients, the means ± SE or medians ± interquartile ranges<sup>3</sup>.

P values between groups: differences between study groups compared by ANOVA or the Kruskal-Wallis test.

\*Control Group exclusion criteria.

and hs-CRP levels were measured using enzymatic and turbidimetric assays (Spinreact, SA, Spain) adapted to the autoanalyser Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, Spain). Levels of sICAM-1 and sE-selectin were assessed using commercial kits (R&D Systems, Spain).

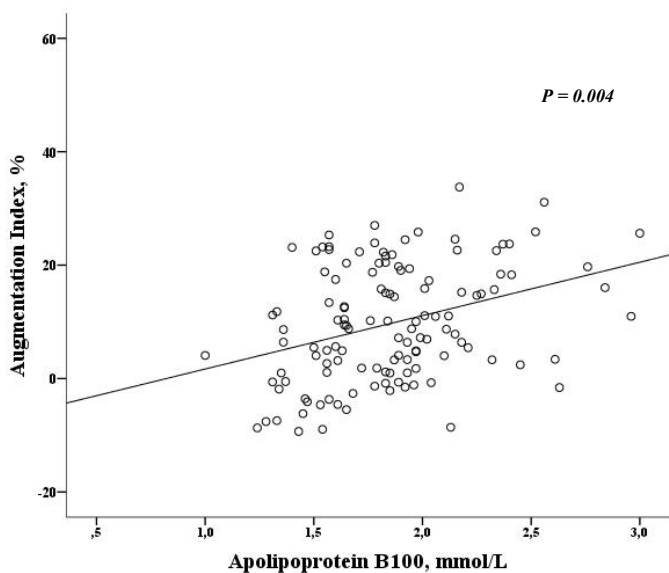
### Statistical Analysis

Anthropometric, biochemical and vascular data are presented as the means ± SD, as the medians and interquartile ranges for continuous variables or as frequencies for categorical variables. Differences between study groups were assessed using ANOVA or the Kruskal-Wallis test for continuous variables and the chi-square test for categorical variables. A univariate statistical model was used to determine the association between AIx and anthropometric, biochemical and vascular data. ROC curves were used to assess carotid

artery thickness differences between FH and CG participants. The multivariate lineal test was used to adjust the augmentation index to the heart rate. Multivariate stepwise linear regression models were used to assess the main predictors of AIx and cIMT in FH patients. Statistical tests and corresponding p-values were two-sided; SPSS version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses.

### Results

Compared with controls, AIx values were higher in FH patients (9.6 ± 17.2% vs. 2.6 ± 10.3%, *p* = 0.011) (**Table 1**). Overall cIMT means were also significantly thicker in FH patients than controls (0.758 ± 0.280 vs. 0.635 ± 0.160 mm, *p* < 0.001). Among the biochemical parameters, FH participants had higher concentrations of LDLc (previous wash-out values



**Fig. 1.** Relationship between Apolipoprotein B-100 concentrations and Augmentation Indices

$r=0.254$ ,  $p=0.004$

Differences were analysed using Pearson's correlation coefficient.

$4.36 \pm 1.75$  mmol/L vs  $3.18 \pm 0.72$ ,  $p=0.004$ ) and apolipoprotein B100 than CG subjects, as expected. FH participants also had significantly higher levels of sE-selectin ( $33.6 \pm 12.2$  vs.  $27.7 \pm 11.7$  ng/ml,  $p=0.005$ ). Thirty-two percent of FH patients were active smokers. Despite this fact, no significant differences were observed in AIx ( $10.7 \pm 15.1$  vs.  $6.3 \pm 14.2\%$ ,  $p=0.101$ ) or in maximum CCA IMT between smokers and non-smokers ( $0.935 \pm 0.241$  vs.  $0.844 \pm 0.152$  mm,  $p=0.088$ ). We found no differences in AIx regarding the genetic diagnoses or the MedPed criteria in FH patients ( $8.5 \pm 16.8\%$  vs  $14 \pm 17.7\%$ ,  $p=0.105$ ).

### Augmentation Index Determinants

In univariate test analysis, the AIx values of FH patients were positively associated with LDLc levels ( $r=0.227$ ,  $p=0.004$ ), non-HDLc levels ( $r=0.255$ ,  $p=0.004$ ), apolipoprotein B100 levels ( $r=0.274$ ,  $p=0.002$ ), triglyceride levels ( $r=0.186$ ,  $p=0.038$ ), glucose levels ( $r=0.192$ ,  $p=0.032$ ), systolic blood pressure ( $r=0.183$ ,  $p=0.041$ ) and maximum CCA IMT values ( $r=0.281$ ,  $p=0.002$ ). The strongest association was observed with respect to age ( $r=0.7$ ,  $p<0.001$ ). Due to this interaction, a corrected variable was performed using a logistic linear model test. AIx values adjusted by age maintained an even stronger association with the above-mentioned biochemical and vascular data (**Fig. 1**). Moreover, sE-selectin was also positively correlated with AIx ( $r=0.187$ ,  $p=0.037$ )

**Table 2.** Relationship of augmentation index to vascular and metabolic parameters in FH patients

	AIx@75	
	<i>r</i>	<i>p</i> -value
Maximum CCA IMT	0.311	<0.001
Non-HDLc	0.255	0.004
Apolipoprotein B100	0.254	0.004
LDLc	0.226	0.011
Glucose	0.195	0.036
Triglyceride	0.187	0.037
sE-Selectin	0.187	0.037
Systolic blood pressure	0.186	0.038

Pearson's correlation test.

(**Table 2**).

Multivariate stepwise linear regression analysis was performed to assess the main predictors of arterial stiffness using AIx as a dependent variable. The independent variables included systolic blood pressure, diastolic blood pressure, waist circumference, glucose, total cholesterol, LDLc, non-HDLc, triglyceride, apolipoprotein B100 and sE-selectin. After adjusting for interactions, the best prediction model included systolic blood pressure, waist circumference, glucose, apolipoprotein B100, triglyceride and sE-selectin (*Durbin-Watson*=2.16 and  $r^2=0.383$ ). When this model was forced, apolipoprotein B100 ( $\beta=0.201$ ,  $p=0.03$ ) remained an independent predictor of AIx@75 (**Table 3a**).

### Carotid Intima-Media Thickness Determinants

The maximum CCA IMT was the most discriminating carotid measurement between FH patients and CG subjects using ROC prediction curves. The area under the curve for these measure between the two study groups was 0.796 (0.720-0.872,  $P<0.001$ ) (not shown in the tables). Individuals in the lowest AIx tertile had lower maximum CCA IMT with respect to individuals in the second tertile ( $0.794 \pm 0.137$  vs.  $0.895 \pm 0.207$  mm,  $P=0.033$ ) or individuals in the highest tertile ( $0.794 \pm 0.137$  vs.  $0.974 \pm 0.178$  mm,  $P<0.001$ ) (**Fig. 2**).

Maximum CCA IMT was used as a dependent variable in our multivariate stepwise linear regression model. Variables associated with this dependent variable include systolic blood pressure, total cholesterol, LDLc, apolipoprotein B100, non-HDLc, triglyceride, glucose and AIx levels. After adjusting for interactions, the best predictor model included AIx along with apolipoprotein B100, systolic blood pressure, triglycerides

**Table 3a.** Determinants of the augmentation index in FH patients

	AIx@75	
	$\beta$ -regression coefficient	<i>p</i> -value
Apolipoprotein B100	0.201	0.03
R <sup>2</sup>	383	

Multivariate stepwise linear regression test.  
 Dependent variable: Augmentation index adjusted by 75 bpm  
 Independent variables: Glucose, Systolic blood pressure, Apolipoprotein B100, Triglyceride  
 Durbin-Watson: 2.161

**Table 3b.** Determinants of maximum common carotid artery thickness in FH patients

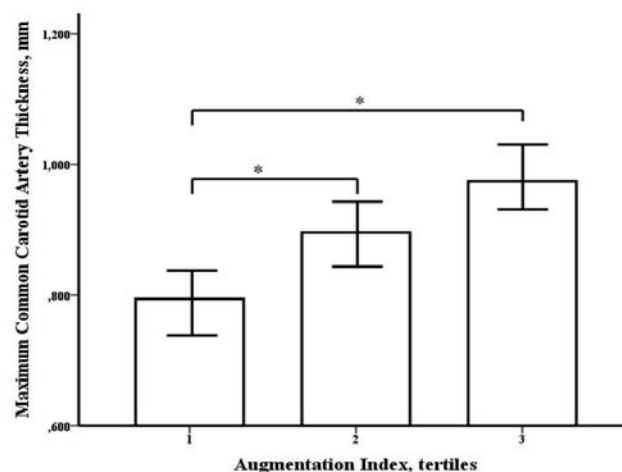
ficient	Maximum CCA IMT	
	<i>p</i> -valucoefficient	<i>p</i> -value
Systolic blood pressure	0.081	0.381
Apolipoprotein B100	0.146	0.119
AIx@75	0.224	0.014
R <sup>2</sup>	0.410	

Multivariate stepwise linear regression test.  
 Dependent variable: Maximum common carotid artery intima-media thickness.  
 Independent variables: Glucose, Systolic blood pressure, Apolipoprotein B100, Triglyceride, AIx@75: augmentation index adjusted to 75 bpm.  
 Durbin-Watson: 1.683

and glucose levels (*Durbin-Watson* = 1.68 and  $r^2 = 0.410$ ). In the forced model, AIx@75 was the main factor associated with maximum CCA IMT ( $\beta = 0.224$ ,  $p = 0.014$ ) (**Table 3b**).

## Discussion

The main observation in this study was that FH patients have increased arterial stiffness, as assessed by AIx, compared to non-FH subjects, which were age- and gender-matched control subjects. There is substantial evidence indicating that arterial stiffness is an independent cardiovascular disease risk factor, as it is observed in high-risk or community-based populations<sup>10, 18, 19</sup>. The underlying physiopathological mechanisms of arterial stiffness are not well known, but global physical haemodynamic derangements, such as flow turbulence and systolic and diastolic hypertension, have been implicated<sup>20</sup>. In a recent meta-analysis of cross-sectional studies, which included more than 26,000 subjects with and without hypertension, the authors observed that with the exception of age and hypertension, arterial stiffness is largely indepen-



**Fig. 2.** Differences in maximum common carotid artery thickness according to AIx tertiles

Individuals in the lower AIx tertile had lower maximum CCA IMT compared to individuals in the second tertile ( $0.895 \pm 0.207$  vs.  $0.794 \pm 0.137$ ,  $p = 0.033$ ) and the highest tertile ( $0.974 \pm 0.178$  vs.  $0.794 \pm 0.137$ ,  $p < 0.001$ ). Each comparison was analysed by ANOVA (Bonferroni test).

dent of classic risk factors of atherosclerosis<sup>15</sup>. Our results show that in a group of 90% normotensive pure hypercholesterolaemic subjects, dyslipidaemia and in particular apolipoprotein B100-rich particles play a role in arterial wall elasticity. In fact, the main lipid parameter associated with AIx in our population was apolipoprotein B100 concentration, even when this relation was adjusted with other possible confounding factors. Accordingly, an increase in arterial stiffness was observed in diet-induced hypercholesterolaemic monkeys<sup>21</sup>. Moreover, aortic elasticity impairment has been observed in FH patients beginning in youth<sup>10, 22</sup> and in middle-aged treated FH patients with or without hypertension<sup>23-24</sup>. Toikka *et al.* observed that individuals with a low HDL/TC ratio compared to those with a high ratio had decreased carotid distensibility<sup>25</sup>. LDL, especially very small and ox LDL may influence vessel wall elasticity by enhancing smooth muscle cell proliferation and vasoconstriction mediated by an increase in intracellular calcium concentrations<sup>26-28</sup>. Arterial wall alterations could be considered a consequence of a process initiated by endothelial dysfunction. In our study, AIx was associated with biochemical markers of endothelial function, such as sE-selectin, thus supporting the relationship between endothelial dysfunction and wall rigidity.

Arterial stiffness was the unique determinant of cIMT in FH patients, and was thicker than in the control group. This observation strongly supports the role of AIx as a measure of vascular risk in FH pa-

tients. Because AIx was also strongly dependent on the amount of apolipoprotein B100-containing lipoprotein, our results suggest that long-term residual hypercholesterolemia in FH patients influences arterial quality. Our patients were controlled in a specialist lipid clinic, and were treated with high-dose statins or lipid-lowering combination drug regimes (when appropriate), which allowed them to achieve therapy targets for a minimum period of three years<sup>5)</sup>. Despite being treated in this manner, clear artery wall alterations could be detected. Our data support the need for earlier and more vigorous treatment and rethinking of the recommended LDL targets in FH patients.

The limitations of our study include the fact that arterial stiffness was determined by AIx obtained from peripheral artery tonometry, which must be considered a surrogate marker of central arterial elasticity; however, this method has the advantage of being relatively less operator-independent and easy to perform in a clinical setting. Another limitation of our study is its observational nature; therefore, we cannot conclude that increased arterial stiffness or decreased apolipoprotein B100 levels influence cIMT in a causal manner. Our study sample size was small, despite the fact that the FH patients included in the study were selected according to a genetic or clinical FH criterion. Our data were obtained from a group of FH patients; therefore, extrapolation regarding the impact of LDLc or statin therapy in other clinical situations must be performed with caution.

## Conclusions

Our cohort of FH patients had increased cIMT and AIx values, despite being treated with the usual clinical management (statin therapy). We showed that AIx is clearly associated with LDL lipoproteins concentrations, and is a determinant of cIMT. New drug target alternatives and more aggressive treatment should be considered to decrease their overall cardiovascular risk.

## References

- 1) Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Ed 8. Edited by Scriver C, Beaudet A, Sly W, and Valle D. New York: McGraw-Hill; 2001; 2863-2913
- 2) de Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, Duriez P, Smit AJ, Fruchart JC, Kastelein JJ: Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation*, 2004; 109: 33-38
- 3) Mohrschladt MF, Westendorp RG, Gevers Leuven JA, Smelt AH: Cardiovascular disease and mortality in statin-treated patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2004; 172: 329-335
- 4) Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, 1995; 333: 1301-1307
- 5) Civeira F: International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2004; 173: 55-68
- 6) Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Amighi J, Sabeti S, Muellner M, Rumpold H, Wagner O, Minar E: Statin therapy improves cardiovascular outcomes of patients with peripheral arterial disease. *Eur Heart J*, 2004; 25: 742-748
- 7) Riggio S, Mandraffino G, Sardo MA, Ludicello R, Camarda N, Imbalzano E, Alibrandi A, Saitta C, Carerj S, Arrigo T, Saitta A: Pulse wave velocity and augmentation index, but not intima media thickness, are early indicators of vascular damage in hypercholesterolemic children. *Eur J Clin Invest*, 2010; 40: 250-257
- 8) Wendelhag I, Wiklund O, Wikstrand J: Atherosclerotic changes in the femoral and carotid arteries in familial hypercholesterolemia. Ultrasonographic assessment of intima-media thickness and plaque occurrence. *Atherosclerosis*, 1993; 103: 1404-1411
- 9) Lane HA, Smith JC, Davies JS: Noninvasive assessment of preclinical atherosclerosis. *Vasc Health Risk Man*, 2006; 2: 19-30
- 10) Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, Jeppesen J: Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation*, 2006; 113: 664-670
- 11) Glasser SP, Arnett DK, McVeigh GE, Finkelstein SM, Bank A, Morgan D, Cohn JN: Vascular compliance and cardiovascular disease: a risk factor or a marker? *Am J Hypertens*, 1997; 10: 1175-1189
- 12) Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, Vita JA, Lewy D, Benjamin EJ: Arterial stiffness and cardiovascular events: The Framingham Heart Study. *Circulation*, 2010; 121: 505-511
- 13) Lehmann ED, Hopkins KD, Gosling RG: Aortic compliance measurements using Doppler ultrasound: in vivo biochemical correlates. *Ultrasound Med Biol*, 1993; 19: 683-710
- 14) Cameron JD, Jennings GL, Dart AM: The relationship between arterial compliance, age, blood pressure and serum lipid levels. *J Hypertens*, 1995; 13: 1718-1723
- 15) Cecelja M, Chowienczyk P: Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension. *Hypertension*, 2009; 54: 1328-1336
- 16) Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, Hopkins PN: Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol*, 1993; 72: 171-176
- 17) Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, Najjar SS, Rembold CM, Post WS: Use of

- carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr*, 2008; 21: 93-111
- 18) Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B, Boutouyrie P: Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke*, 2003; 34: 1203-1206
  - 19) Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Hofman A, van Popele NM, Bos ML, Schalekamp MA, Asmar R, Reneman RS, Hoeks AP, Breteler MM, Witteman JC: Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: The Rotterdam Study. *Circulation*, 2006; 113: 657-663
  - 20) Laurent S, Cockcroft J, van Bortel L, Boutouyrie P, Giannastasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H: Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*, 2006; 21: 2588-2605
  - 21) Farrar DJ, Bond MG, Riley WA, Sawyer JK: Anatomic correlates of aortic pulse wave velocity and carotid artery elasticity during atherosclerosis progression and regression in monkeys. *Circulation*, 1991; 83: 1754-1763
  - 22) Pitsavos C, Toutouzas K, Dernellis J, Skoumas J, Skoumbourdis E, Stefanidis C, Toutouzas P: Aortic stiffness in young patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am Heart J*, 1998; 135: 604-608
  - 23) Smilde TJ, van der Berkmortel FW, Wollersheim H, van Langen H, Kastelein JJ, Stalenhoef AF: The effect of cholesterol lowering on carotid and femoral artery wall stiffness and thickness in patients with familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Invest*, 2000; 30: 473-480
  - 24) Masoura C, Pitsavos C, Aznaouridis K, Skoumas I, Vlachopoulos C, Stefanidis C: Arterial endothelial function and wall thickness in familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia and the effect of statins. A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 2010; 214: 129-138
  - 25) Toikka JO, Niemi P, Ahotupa M, Ninikoski H, Viikari JS, Ronnema T, Hartiala JJ, Raitakari OT: Large-artery elastic properties in young men: relationships to serum lipoproteins and oxidized low-density lipoproteins. *Atheroscler Tromb Vasc Biol*, 1999; 19: 436-441
  - 26) Auge N, Fitoussi G, Bascands JL, Pieraggi MT, Junquero D, Valet P, Girolami JP, Salvayre R, Negre-Salvayre A: Mildly oxidized LDL evokes a sustained Ca<sup>2+</sup>-dependent retraction of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1996; 79: 871-880
  - 27) Zhao B, Ehringer WD, Dierichs R, Miller FN: Oxidized low-density lipoprotein increases endothelial intracellular calcium and alters cytoskeletal f-actin distribution. *Eur J Clin Invest*, 1997; 27: 48-54
  - 28) Takahashi R, Imamura A, Yoshikane M, Suzuki M, Murakami R, Cheng XW, Numaguchi Y, Ikeda N, Moruhara T, Okumura K: Very small low-density-lipoprotein cholesterol level is a determinant of arterial stiffness in men with impaired glucose metabolism. *J Atheroscler Thromb*, 2010; 17: 1282-1289



## 2on Objectiu





**2<sup>on</sup> Objectiu. Demostrar que els canvis terapèutics d'estil de vida poden millorar la reactivitat hiperèmica de les artèries de petita mida.**

- D. Estudi prospectiu a 1 any de l'efecte dels canvis terapèutics d'estil de vida sobre la reactivitat hiperèmica en 150 pacients amb obesitat abdominal.

**Article.**

Ferré R, Plana N, Merino J, Aragonès G, Girona J, Heras M, Coll B, Cos R, Masana L. Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010 Aug 11.



#### 7.4. Estudi D

Títol: *Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity.*

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2010 Aug 11.

Objectiu: La obesitat abdominal està associada a alteracions de la funció endotel·lial i amb un increment del risc cardiovascular. Els canvis terapèutics de l'estil de vida redueixen el risc cardiovascular però l'impacte sobre la funció endotel·lial mesurada per tonometria arterial perifèrica és desconegut. En aquest estudi es valora de forma prospectiva els efectes dels canvis terapèutics de l'estil de vida sobre la funció endotel·lial mesurada per tonometria arterial perifèrica de pacients amb risc cardiovascular augmentat i obesitat abdominal.

Mètodes: 150 voluntaris amb obesitat abdominal i risc cardiovascular moderat es dividiren aleatòriament en 2 grups que varen rebre durant un any una intervenció intensa dels canvis terapèutics d'estil de vida o el seguiment clínic habitual. Els estudis vasculars, consistents en l'estudi de la funció de l'endoteli i el gruix íntima-mitja carotídi, així com la valoració de l'estil de vida, van efectuar-se abans i després de la intervenció.

Resultats: La hiperèmia reactiva va millorar en el grup intervenció mentre que en el grup control empitjorà. El risc cardiovascular global fou menor en el grup intervenció al cap d'un any, sobretot a expenses d'una reducció significativa de la pressió arterial sistòlica i un augment en el colesterol HDL i de la apolipoproteïna A. Un major nombre de pacients varen abandonar el tabaquisme i augmentaren l'exercici físic en el grup intervenció *versus* el grup control. El compliment d' almenys 2 dels canvis d'estil de vida proposats s'associaren a un augment de la reactivitat hiperèmica a l'any de seguiment.

Aquest increment en el marcador indirecte de funció endotel·lial es va acompanyar d'una menor progressió en el gruix íntima-mitja carotídi.

Conclusions: La adherència a un programa intens de canvis terapèutics d'estil de vida redueix el risc cardiovascular global i millora la reactivitat hiperèmica d'artèries de mida petita. L'augment en la capacitat vasodilatadora és un principal determinant d'una menor progressió del gruix íntima-mitja carotídi.



ELSEVIER

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



journal homepage: [www.elsevier.com/locate/nmcd](http://www.elsevier.com/locate/nmcd)

Nutrition,  
Metabolism &  
Cardiovascular Diseases

# Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity

R. Ferré<sup>a,b</sup>, N. Plana<sup>a,b</sup>, J. Merino<sup>a,b</sup>, G. Aragonès<sup>a,b</sup>, J. Girona<sup>a,b</sup>,  
M. Heras<sup>a,b</sup>, B. Coll<sup>a,b</sup>, R. Cos<sup>a,b</sup>, L. Masana<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Vascular Medicine and Metabolism Unit and Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, C. Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain

<sup>b</sup> CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Barcelona, Spain

Received 29 January 2010; received in revised form 18 April 2010; accepted 19 April 2010

## KEYWORDS

Abdominal obesity;  
Therapeutic lifestyle  
changes;  
Peripheral artery  
tonometry;  
Endothelial function;  
Cardiovascular risk

**Abstract** *Background and aims:* Abdominal obesity (AO) is associated with endothelial function (EF) alteration and increased global cardiovascular (CV) risk. Therapeutic lifestyle changes (TLSC) reduce CV risk, but the impact on EF assessed by peripheral artery tonometry (PAT) is unknown. In this study, we aimed to prospectively assess the effects of TLSC on EF measured by PAT in increased CV risk patients with AO.

*Methods and results:* 150 patients with AO and moderate CV risk were randomized to groups receiving a one-year intervention of either conventional medical care (control group, CG) or an intensive TLSC program (intervention group, IG). Vascular studies (EF by PAT, intima-media thickness (IMT)) and lifestyle (LS) assessment were performed before and after intervention. The PAT ratio improved in the IG and worsened in the CG. The global CV risk was reduced ( $P = 0.017$ ) in the IG due to a significant decrease in systolic blood pressure ( $P < 0.001$ ), increase in HDL cholesterol and ApolipoproteinA1 ( $P = 0.013$ ). More individuals in the IG than in the CG quit smoking ( $P = 0.001$ ) and increased their physical activity ( $P = 0.014$ ). The improvement in at least two LS components was associated with a PAT ratio increase (2.44 IC: 95% 0.99–6.00,  $P = 0.051$ ). The PAT ratio increase determined less IMT progression (–1.1 IC: 95% 0.91–1.00,  $P = 0.053$ ).

*Conclusions:* Good adherence to a TLSC program reduces global CV risk and determines PAT ratio improvement. The PAT ratio increase is the main determinant of lower IMT progression.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Vascular Medicine and Metabolism Unit and Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, C. Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Tel.: +34 977759366; fax: +34 977759322.

E-mail address: [luis.masana@urv.cat](mailto:luis.masana@urv.cat) (L. Masana).

## Introduction

Abdominal obesity (AO) has been associated with an increased risk of major cardiovascular problems. Along with lipid alterations, hypertension and dysglycemia define the metabolic derangement referred to as metabolic syndrome. Many epidemiological studies have demonstrated that obesity, particularly visceral fat accumulation, determines an increased cardiovascular (CV) risk [1]. Central obesity is considered to have a causal role in atherosclerosis pathogenesis via induction of endothelial dysfunction [2]. Adipose tissue synthesizes a large variety of molecules modulating, among other functions, satiety, insulin resistance, inflammation, redox status and lipid metabolism [1].

Central obesity is clinically assessed by the waist circumference (WC) measurement. This anthropometric parameter is strongly linked to CV risk at the epidemiological level [3]. The clinical assessment of endothelial function (EF) is more difficult. Among a wide range of endothelial function tests, arterial dilation capacity after ischemia has often been used as a marker of endothelial dysfunction. Flow Mediated Dilation (FMD), measured as the post-ischemia diameter increase in the arm arteries, has been associated with CV risk and is associated with EF plasma biomarkers [4]. One of the problems of the technique is that its application requires well-trained personnel, limiting its clinical use [5].

In recent years, new operator-independent EF measurement techniques have been developed. One such method, Peripheral Artery Tonometry (PAT), seems to be a reliable method [6] that is applicable to a wide age range of patients and can detect vascular alterations in patients at high cardiovascular risk [7]. PAT is a non-invasive technology that captures a beat-to-beat plethysmographic recording of the finger arterial pulse wave amplitude (PWA) using pneumatic probes. It has been demonstrated that PWA is associated with nitric oxide (NO) function [8]. Moreover, this method has been compared with vasodilator response to intracoronary acetylcholine, considered to be the gold standard technique; it shows about 80% sensitivity and specificity to detect coronary endothelial dysfunction [6]. Recently, a general population-based study showed that the PAT ratio is correlated with cardiovascular risk factors [9]. The utility of PAT values in improving the ability to predict the occurrence of cardiovascular events is currently being evaluated [10]. Central obesity and other cardiovascular risk factors can be clinically managed with appropriate educational therapies aimed at modifying patient lifestyles (LS). These include quitting smoking, increasing physical activity and maintaining a proper diet. Nevertheless, evidence showing that therapeutic lifestyle changes program (TLSC) reduce CV morbidity and mortality is scarce [11,12], and it is difficult to obtain strong and clear scientific data [13]. On the other hand, existing preliminary evidence shows positive effects of LS modifications on surrogate CVD markers like EF, inflammation and intermediate risk factors [14–17]. In this study, we have evaluated the impact of intensive and global LS advice delivered to patients with abdominal obesity and increased cardiovascular risk or cardiovascular risk factors, specifically EF as assessed by PAT.

## Methods

### Study participants

One hundred and fifty men and women from 30 to 75 years of age without previous cardiovascular disease who attended the Vascular Medicine and Metabolism Unit of University Hospital Sant Joan in Reus (Spain) were included in the study. The inclusion criteria were abdominal obesity assessed by WC according the ATPIII parameters plus intermediate-high Framingham score risk, diabetes or metabolic syndrome according to the ATPIII criteria [18]. Patients with previous cardiovascular disease, chronic renal, hepatic, pulmonary or neurodegenerative problems, neoplasm antecedents or other severe chronic disease were not included.

### Design, randomization, clinical assessment and intervention

This open, one-year prospective intervention study included 150 randomized patients stratified by gender. A complete physical examination including LS components (diet, physical activity and smoking) and anthropometry assessment as well as biochemical and vascular studies (Intima-media thickness (IMT) and PAT) were performed for each patient before and after one-year of follow-up. The TLSC program promoted a Mediterranean diet adapted to patient CV risk factors, increased physical activity and cessation of smoking in patients who smoked. Participants assigned to the control group (CG,  $n = 82$ ) received standard care, including medical and dietician visits at four-month intervals. In addition, patients assigned to the intervention group (IG,  $n = 68$ ) received an intensive program of monthly small group ( $n = 8-10$ ) educational meetings on LS modification. These included information on the benefits of a Mediterranean diet and physical activity. Those patients who smoked, quitting smoking advice were received. Patients in the IG were enrolled in a specific physical activity program under the surveillance of the Sport Medicine Unit in the hospital. Physical activity was quantified as METs/week using the Minnesota questionnaire adapted for the Spanish population [19]. A 3-day food-intake register was used to evaluate diet. The food data of dietary records were converted to energy and nutrients data by experienced dietician and analyzed using the PCN (cesnid nutritional program, version 2.0, Barcelona, Spain). Tobacco status was also assessed using standardized questionnaires administered by health care providers [20]. The improvement in each LS component was defined as a reduction in total energy intake, increase in the number of METs/week and cessation of smoking at one-year of follow-up. The global CV risk was assessed using the Framingham risk score.

Pharmacological treatment was maintained or administered *de novo* to patients in both groups according to clinical indications, regardless of the group to which patients were assigned. The study was approved by the clinical and investigation committee of the "Hospital Universitari Sant Joan"; all subjects provided written informed consent.

## Lifestyle changes and peripheral artery tonometry

## Endothelial function measurement

Endothelial function was measured using PAT technology (Endo-PAT 2000, Itamar Medical Ltd., Israel). Patients were in a fasting state and had refrained from smoking or strenuous exercise. The test was performed in a quiet room at 22–24 °C. To perform the measurements, two probes are placed on a finger on both hands. After a stabilization period, a 5-min period of ischemia was induced in the test arm by inflating a blood pressure cuff, which was then released. Special software calculated the ratio in pulse wave amplitude before and after ischemia in comparison to the control arm.

## Intima-media thickness determination

An Acuson Sequoia ultrasound system (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) equipped with a linear array ultrasound probe (8L5 5–12 MHz small parts broadband transducer) was used for carotid IMT measurement of the right and left far wall of common carotid arteries (CCAs), carotid bifurcations (CBs) and internal carotid arteries (ICAs) [21]. The mean of these six determinations defined the IMT mean.

## Biochemical determinations

Cholesterol, triglycerides, glucose, direct LDL and HDL cholesterol, ApolipoproteinA1, ApolipoproteinB100 and hsCRP levels were measured using enzymatic and turbidimetric assays (Spinreact, SA, Spain) adapted to the auto-analyzer Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, Spain). In diabetic patients, HbA1c was measured by high performance liquid chromatography on a Hi-auto A1c HA-8140 (Arkray KDR Corporation-Menarini Diagnostics, Florence, Italy).

## Statistical procedures

Data from the baseline and at one-year follow-up are presented as mean  $\pm$  SD or as median and interquartile range for continuous variables and as frequencies for categorical variables. The observed differences were analyzed using the paired *t*-test, Wilcoxon test or chi-squared test when indicated. The effects of intervention on different variables were assessed by comparing variations between groups using an ANOVA or Kruskal–Wallis test for continuous variables and the chi-squared test for categorical variables. Pearson correlations were used to determinate the association between physical activity and anthropometric or biochemical data. Stepwise logistic regression analyses were used to examine the association between dependent variables, Endo-PAT improvement and mean CCA IMT with changes in the biochemical, LS, vascular and anthropometric data. Statistical tests and corresponding *p*-values were two-sided; SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses.

## Results

Sixty-eight patients were allocated to the IG and 82 to the CG. Six patients from the IG withdrew, and two were lost

during follow-up. Sixty patients in the IG group and 82 patients in the CG group completed the study. Fig. 1.

## LS changes

Table 1 shows characteristics of study participants and LS components changes before and after intervention. The number of individuals quitting smoking was higher in the IG ( $P = 0.013$ ). The METs/week increased significantly in the IG (6.7 METs/week,  $P < 0.001$ ). Total energy intake did not change in the IG and decreased in the CG due to a lower intake of carbohydrates ( $P = 0.045$ ). The main nutritional change in the IG was an increase in monounsaturated fatty acid intake (MUFAs) ( $P = 0.028$ ) with the same percentage of total and saturated fat intake.

The increase in physical activity was significantly inversely correlated to weight ( $r = -0.260$ ,  $P = 0.045$ ), BMI ( $r = -0.289$ ,  $P = 0.025$ ), WC ( $r = -0.357$ ,  $P = 0.005$ ) and glycemia ( $r = -0.349$ ,  $P = 0.006$ ) and positively to HDL cholesterol ( $r = 0.258$ ,  $P = 0.046$ ) in the IG. These correlations were weaker or not significant in the CG. The increase in MUFA intake was associated to less IMT progression ( $r = -0.231$ ,  $P = 0.016$ ). Those patients who

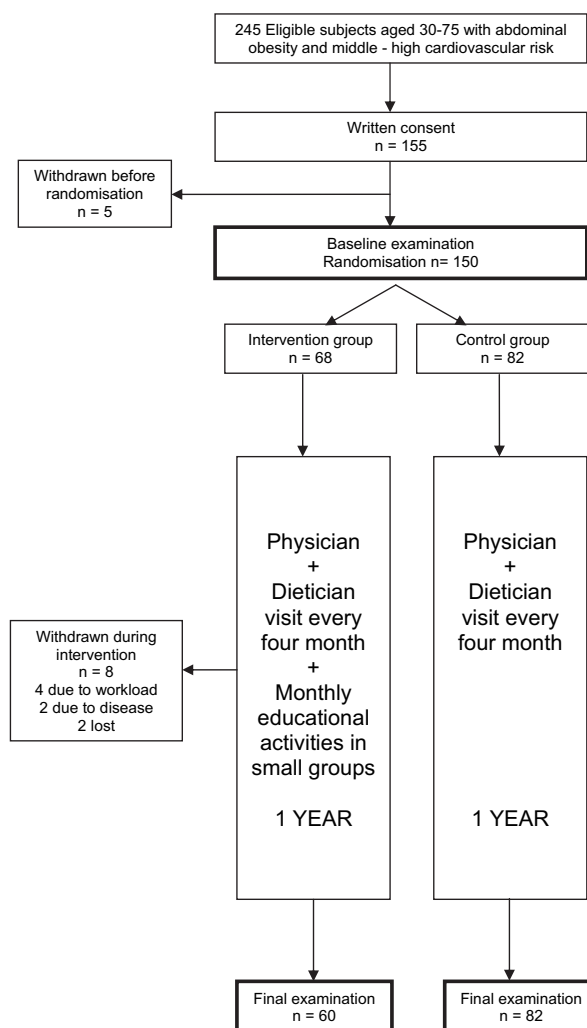


Figure 1 Flow chart of enrollment and follow-up.

**Table 1** Demographic and LS component data at baseline and one-year after follow-up.

	All (n = 142)			Intervention group (n = 60)			Control group (n = 82)			P <sup>b</sup> between groups
	Baseline	1 year	P <sup>a</sup>	Baseline	1 year	P <sup>a</sup>	Baseline	1 year	P <sup>a</sup>	
Age (years)	54.1 ± 10.1			54.8 ± 9.1			53.5 ± 10.8			NS
Gender (% men)	74.6			73.3			75.6			NS
Hypertensive (%)	56.3			63.3			51.2			NS
Diabetes mellitus (%)	34.5			40.0			30.5			NS
Smokers (%)	39.4	32.4	0.001	30.0	20.0	0.013	46.3	41.5	0.045	NS
Physical Activity (Mets/wk)	22.0 ± 11.3	24.1 ± 12.4	0.014	25.4 ± 14.2	34.3 ± 11.2	<0.000	15.4 ± 12.9	18.2 ± 12.8	NS	0.003
Total Energy (Kcal/d)	1724 ± 527	1639 ± 410	NS	1580 ± 458	1572 ± 361	NS	1836 ± 553	1691 ± 440	0.029	NS
Protein (%)	21.8 ± 5.1	22.1 ± 5.1	NS	22.8 ± 5.0	22.1 ± 4.1	NS	21.0 ± 4.9	22.1 ± 5.9	NS	NS
Carbohydrates (%)	37.2 ± 8.0	35.2 ± 7.1	0.020	38.4 ± 8.2	36.9 ± 7.0	NS	36.2 ± 7.7	34.0 ± 6.8	0.045	NS
Fat Intake (%)	39.2 ± 8.1	40.8 ± 6.7	NS	37.8 ± 7.6	40.2 ± 6.9	NS	40.3 ± 8.3	41.3 ± 6.6	NS	NS
SFAs (%)	10.1 ± 2.8	10.2 ± 2.3	NS	9.9 ± 3.1	9.9 ± 2.5	NS	10.3 ± 2.7	10.8 ± 2.2	NS	NS
MUFAs (%)	19.5 ± 5.2	20.8 ± 4.2	0.051	18.8 ± 5.2	21.0 ± 4.4	0.028	20.1 ± 5.2	20.7 ± 4.1	NS	NS
PUFAs (%)	5.9 ± 1.8	6.2 ± 1.8	NS	5.6 ± 1.7	6.2 ± 1.7	NS	6.2 ± 1.8	6.3 ± 2.0	NS	NS

SFAs, saturated fatty acids; MUFAs, monounsaturated fatty acids; PUFAs, polyunsaturated fatty acids.

Values are given as the mean ± SE or percentage of patients.

<sup>a</sup> Baseline compared with one-year follow-up with a Student's paired *t*-test for continuous variables or chi-squared test for categorical variables.

<sup>b</sup> Derived with an ANOVA for continuous variables or chi-squared test for categorical variables.

quit smoking had a better PAT ratio evolution ( $P < 0.001$ ). Twenty-six percent of patients in the IG and only 13% in the CG ( $P = 0.052$ ) showed an improvement in at least two of the three LS components.

### Anthropometric and biochemical changes

Table 2 shows basal and one-year follow-up anthropometric and biochemical parameters for the entire group and randomization arm. At one-year of follow-up, the burden of CV risk, as assessed by Framingham, was significantly reduced in the IG ( $P = 0.017$ ). These participants had a statistically significant improvement in WC, systolic and diastolic blood pressure and ApolipoproteinA1 levels.

### Vascular changes

The median PAT ratio increased by 0.05 units in the IG, whereas it decreased by a similar amount in the CG. Although these differences did not reach statistical significance, the median PAT ratio difference was significantly higher after the intervention period when the whole group was considered ( $P = 0.043$ ). The mean CCA IMT was reduced ( $P = 0.057$ ).

The positive change in at least two LS components was associated with an improvement in EF, who showed both a higher PAT ratio and a greater increase from basal values compared to those subjects with only one LS component change, Fig. 2. These results were confirmed in a stepwise logistic regression model in which improvement in two LS components determined a significant PAT ratio increase in comparison to improvement in only one LS component (OR 2.4. IC: 95% 0.9–6.0,  $P = 0.051$ ); variables included in the model were age, gender, improved in at least two LS components, triglycerides according to the ATPIII criteria, improved WC, LDLc and hsCRP. The correct global percentage of the model was 62%, and the model explained 13.4% of the variability in the PAT ratio. When LS components were assessed separately in another stepwise logistic regression model, smoking cessation was the main predictor of EF improvement (OR 13.8. IC: 95% 1.6–119.9,  $P = 0.017$ ). The correct global percentage of the model was 71%, and it explained 25.9% of the variability in the PAT ratio. Age and changes in pulse pressure were related to the PAT ratio increase in both stepwise logistic regression models.

Larger PAT ratio increases were associated with less IMT progression, Fig. 2. A stepwise logistic regression model including smoking cessation, increased physical activity, decreased energy intake, increased HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, hsCRP, glucose, pulse pressure and PAT ratio changes was applied. The PAT ratio improvement was associated with a better evolution of the mean CCA IMT (OR – 1.1. IC: 95% 0.9–1.0,  $P = 0.053$ ). The correct global percentage of the model was 63%, and it explained 15.1% of the variability in the PAT ratio.

### Discussion

The main hypothesis tested in this study was that EF, as assessed by PAT, would improve after the administration



**Table 2** Anthropometric, biochemical and vascular data at baseline and one-year after TLSC programme.

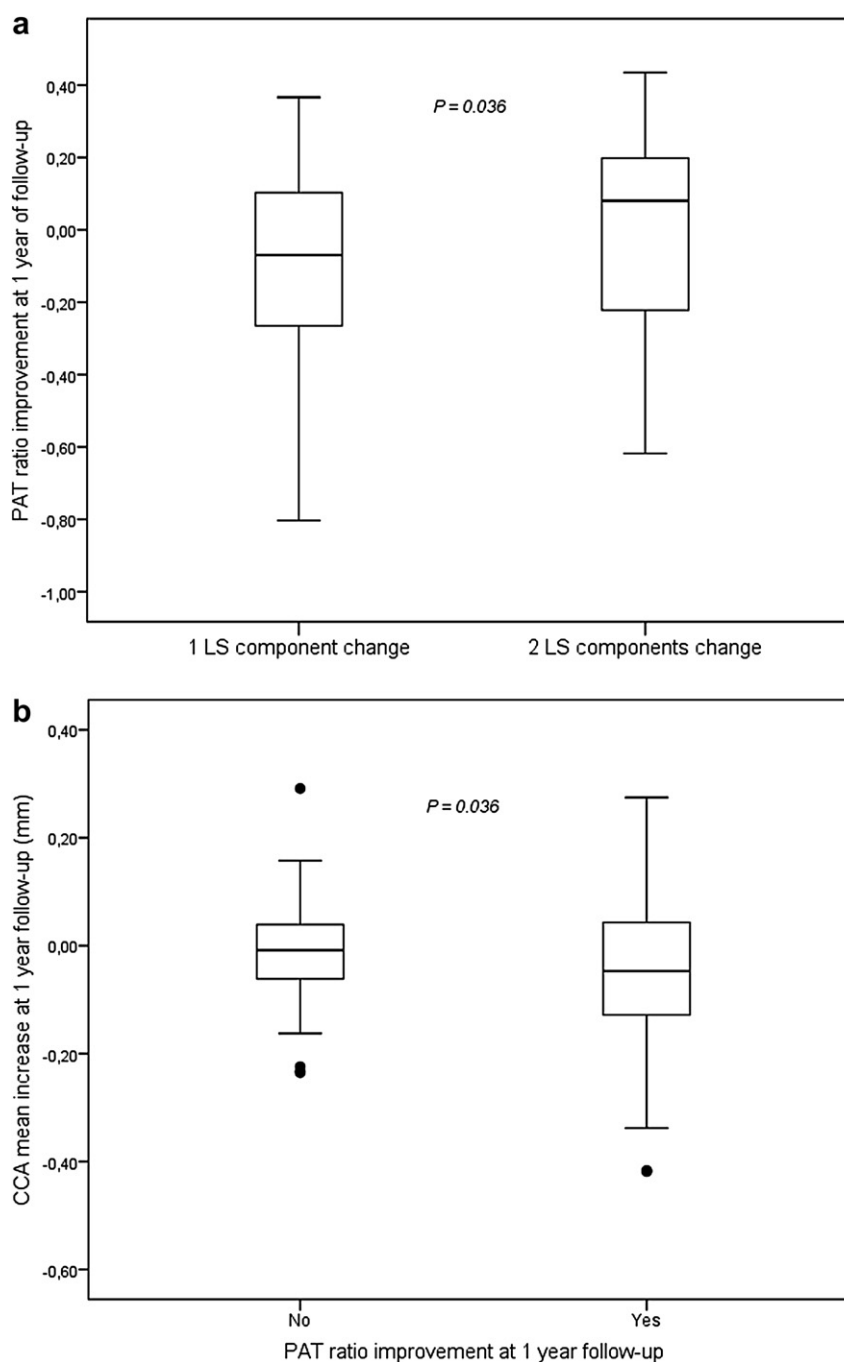
	All (n = 142)			Intervention group (n = 60)			Control group (n = 82)			P <sup>b</sup> between groups
	Baseline	1 year	P <sup>a</sup>	Baseline	1 year	P <sup>a</sup>	Baseline	1 year	P <sup>a</sup>	
Body weight (kg)	88.5 ± 13.5	88.4 ± 14.4	NS	87.8 ± 13.6	87.0 ± 15.0	NS	89.0 ± 13.4	89.4 ± 14.0	NS	NS
BMI (kg m <sup>-2</sup> )	31.6 ± 3.6	31.5 ± 4.0	NS	31.4 ± 3.6	31.1 ± 4.1	NS	31.8 ± 3.7	31.9 ± 3.9	NS	NS
Waist circumference (cm)	105.5 ± 8.7	104.5 ± 10.0	0.019	104.8 ± 8.9	103.2 ± 10.2	0.019	106.0 ± 8.7	105.5 ± 9.8	NS	NS
Systolic BP (mmHg) <sup>c</sup>	135.5 ± 18	130.0 ± 20	<0.001	137.7 ± 19.4	131.8 ± 14.0	0.010	137.7 ± 15.5	133.5 ± 15.8	0.011	NS
Diastolic BP (mmHg) <sup>c</sup>	83.5 ± 10	80.0 ± 10	0.003	84.1 ± 11.7	80.2 ± 8.1	0.018	83.5 ± 10	80.0 ± 10	NS	NS
Total cholesterol (mmol L <sup>-1</sup> )	5.16 ± 1.43	5.01 ± 1.42	0.037	5.19 ± 1.16	5.03 ± 1.01	NS	5.34 ± 1.30	5.17 ± 1.68	0.050	NS
LDL cholesterol (mmol L <sup>-1</sup> )	3.32 ± 0.92	3.12 ± 0.94	0.005	3.19 ± 0.87	3.08 ± 0.90	NS	3.43 ± 0.95	3.16 ± 0.97	0.013	NS
HDL cholesterol (mmol L <sup>-1</sup> )	1.34 ± 0.26	1.33 ± 0.27	NS	1.32 ± 0.25	1.34 ± 0.26	NS	1.36 ± 0.27	1.33 ± 0.28	NS	NS
Triglycerides (mmol L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	2.28 ± 1.75	2.08 ± 1.66	0.044	2.17 ± 1.79	1.94 ± 1.50	NS	2.46 ± 1.67	2.10 ± 1.67	NS	NS
ApolipoproteinB100 (mg dL <sup>-1</sup> )	118.6 ± 22.8	115.9 ± 34.6	NS	115.9 ± 21.3	118.7 ± 44.1	NS	120.5 ± 23.8	113.8 ± 25.5	NS	NS
ApolipoproteinA1 (mg dL <sup>-1</sup> )	132.56 ± 13.82	134.73 ± 13.78	0.012	131.1 ± 13.7	134.7 ± 14.4	0.010	133.6 ± 13.9	134.8 ± 13.3	0.011	NS
Glucose (mmol L <sup>-1</sup> )	5.94 ± 2.21	5.94 ± 2.17	NS	6.03 ± 2.94	6.04 ± 2.71	NS	5.91 ± 2.05	5.77 ± 1.73	0.006	0.022
HsCRP (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	1.64 ± 3.04	1.44 ± 2.84	NS	1.62 ± 2.03	1.27 ± 2.28	NS	1.80 ± 3.97	1.54 ± 3.62	0.028	NS
Framingham risk score (%)	11.54 ± 6.81	10.74 ± 6.11	0.033	11.03 ± 5.49	10.03 ± 4.98	0.017	11.9 ± 7.6	11.2 ± 6.8	NS	NS
PAT ratio (U) <sup>c</sup>	1.567 ± 0.404	1.569 ± 0.264	0.043	1.559 ± 0.386	1.610 ± 0.260	NS	1.580 ± 0.410	1.529 ± 0.268	NS	NS
CCA mean (mm)	0.757 ± 0.164	0.726 ± 0.104	0.010	0.751 ± 0.154	0.719 ± 0.110	0.057	0.762 ± 0.172	0.729 ± 0.101	NS	NS
IMT mean (mm)	0.805 ± 0.150	0.815 ± 0.115	NS	0.799 ± 0.132	0.815 ± 0.110	NS	0.809 ± 0.163	0.814 ± 0.119	NS	NS

HsCRP: High sensitive C-reactive protein; BP: Blood pressure, PAT: Peripheral Artery Tonometry, CCA: Carotid Common Artery, IMT: Intimae-Media Thickness.

<sup>a</sup> Baseline compared with one-year follow-up with a paired *t*-test or Wilcoxon test for continuous variables.

<sup>b</sup> CG compared with IG with an ANOVA or Kruskal–Wallis test for continuous variables.

<sup>c</sup> Values are given as the mean ± SE or median ± interquartile range.



**Figure 2** PAT ratio improvement according the change in one or two lifestyle components. One component:  $-0.118 \pm 0.447$ ,  $n = 63$ ; two components:  $0.022 \pm 0.341$ ,  $n = 27$ .  $P = 0.036$ . Values are expressed as median  $\pm$  interquartile range. Mean CCA IMT changes according to the PAT ratio improvement. Whole group ( $n = 131$ ). No PAT ratio improvement:  $-0.01 \pm 0.09$ ,  $n = 72$ . PAT ratio improvement:  $-0.05 \pm 0.15$ ,  $n = 59$ .  $P = 0.036$ . Values are expressed as the mean  $\pm$  SE.

of a LS program to a group of patients with AO and increased overall CV risk. The PAT ratio significantly changed in the whole group after the intervention period. In the IG, a non-significant trend of PAT ratio improvement was observed, whereas it tended to worsen in the CG. Independent of the therapy group, those subjects improving at least two of lifestyles components (i.e., diet, physical activity or smoking) demonstrated more PAT ratio improvement and a higher final PAT ratio than those

improving only one of the parameters. Therefore, the effect on the PAT ratio was clearly associated with the magnitude of TLSC independent of the assigned group. Among the TLSCs, quitting smoking and increasing physical activity had the greatest influence on the PAT ratio. Many studies have shown the positive effects of diet, tobacco cessation and exercise on EF [22–24]. However, this is the first study showing that TLSCs have a beneficial impact on the PAT ratio.

In this study, we observed a moderate but significant improvement in various CV risk factors over a one-year follow-up period that led to a significant decrease in the global CV risk for patients assessed by the Framingham score.

LS improvement in the IG was more extensive than that in the CG. This was particularly notable with respect to the number of people quitting smoking, increasing physical activity and reducing WC, parameters serving as the cornerstone variables of cardiovascular prevention. In comparison to the CG, more than twice as many patients in the IG achieved improvement in at least two of the above-mentioned LS components (26% vs. 13%,  $P = 0.052$ ). Although the absolute magnitude of these changes was relatively small, it was similar to those reported in other studies [25,26]. There are several reasons for the relatively weak effectiveness of TLSC. In our study, the patients had already been treated and were in a clinical steady state, following prescribed therapy. Additionally, the patients in the IG demonstrated rather low compliance with the TLSC program. Eight were lost during follow-up; only about 70% attended at least 50% of the sessions, and just 30% attended more than 75% of sessions despite close follow-up including telephone calls to accommodate schedules to patient needs. In spite of this, the level of adherence in our study was similar to that reported in other lifestyle intervention studies involving obese, type 2 diabetic or metabolic syndrome populations, Yannakoulia et al. observed a dropout rate of about fifty percent from a TLSC program administered to diabetic patients [27].

The absolute magnitude of these changes was similar to that in other studies. Eriksson et al. reported a small improvement in cardiovascular risk factors in a group of patients following a TLSC program, and the WC also decreased by 2 cm in that study [28]. Other studies yielded very similar results, especially when the observations are extended in time [29].

The mean CCA IMT, which is generally used to assess CV risk due to its increased robustness [21], improved near to statistical significance in the IG. Similar observations have also been reported in other studies based on pharmacological intervention [30]; however, little data on the impact of TLSC on CCA IMT exist. Increased physical activity and a Mediterranean diet have been associated with IMT improvement [31,32]. Since IMT is strongly influenced by SBP, it is likely that the 6-mm Hg decrease observed in the IG could account for the IMT variation in this group.

We have observed that cessation of smoking is the strongest determinant of PAT ratio improvement even more than enhanced physical activity. In addition, the increase on physical activity did not influence significantly metabolic parameters or changes in body mass index in the whole studied population. This observation is in concordance with similar studies correlating tobacco and EF markers [17,33].

It is remarkable that patients in the IG whose PAT ratio improved showed a better IMT outcome. This is the first time that the correlation of an improved PAT ratio and better IMT evolution has been demonstrated. It has been reported that EF evolution as assessed by FMD is a good predictor of IMT evolution [34]. Our results support this observation and extend it to the PAT technique. The PAT

ratio and IMT are only weakly correlated and should be considered independent markers of vascular status.

Pharmacological treatment such as aspirin, renin-angiotensin system inhibitors or statins had been associated with EF improvement in some studies. The percentages of patients under treatment for these drugs were not statistically different at baseline. At one-year follow-up there was an increase of the number of patients treated with aspirin and statins in a similar manner in both groups.

In conclusion, TLSC programs improve the burden of cardiovascular risk in AO patients at moderate-to-high cardiovascular risk in primary prevention. TLSC programs that are intensively and professionally delivered should be the first step in CV risk management. The magnitude of TLSC success is associated with PAT ratio improvement. Cessation of smoking and increased physical activity were the main mediators of EF recovery as assessed by PAT. Moreover, PAT ratio improvement is a marker of a lower IMT progression. These results show the importance of TLSC, in particular quitting smoking and physical exercise, in combination with pharmacological treatment for cardiovascular risk factors leading to a multifactorial approach prevention.

## Study limitations

Limitations of our study to be considered are the dropout rate at the follow-up due to the difficulties of adherence and compliance of the TLSC sessions related to personal problems, difficulties in the accommodation of the sessions with the occupation or disease presentation.

Changes observed on EF and IMT may not be striking considering the relative small population size and only one-year of follow-up. This fact could also explain that we observed trends in some results that not achieve a statistical significance. Changes in IMT could be better quantified by a higher resolution ultrasound technique such as radio-frequency signal.

## Disclosure statement

The authors of the manuscript declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from ISCIII, Madrid, Spain (PI 05/1954). CIBERDEM is an initiative of ISCIII, Spain.

## References

- [1] Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I, Després JP. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension* 2009;53:577–84.
- [2] Patel AR, Hui H, Kuvin JT, Pandian NG, Karas RH. Modestly overweight women have vascular endothelial dysfunction. *Clin Cardiol* 2009;32:269–73.
- [3] Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1039–49.

- [4] Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007;115:2390–7.
- [5] Stout M. Flow-mediated dilatation: a review of techniques and applications. *Echocardiography* 2009;26:832–41.
- [6] Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes Jr DR, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137–41.
- [7] Chouraqui P, Schnall RP, Dvir I, Rozanski A, Qureshi E, Arditti A, et al. Assessment of peripheral artery tonometry in the detection of treadmill exercise-induced myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:2195–200.
- [8] Chirinos JA, David R, Bralley JA, Zea-Díaz H, Muñoz-Atahualpa E, Corrales-Medina F, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors, arterial hemodynamics, and subclinical vascular disease: the PREVENCIÓN Study. *Hypertension* 2008;52:1051–9.
- [9] Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:2467–74.
- [10] Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J Adv Access*; 2010:24.
- [11] Uusitupa M, Peltonen M, Lindstrom J, Aunola S, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, et al. Ten-year mortality and cardiovascular morbidity in the Finnish Diabetes Prevention Study—secondary analysis of the randomized trial. *PLoS One* 2009;4:e5656.
- [12] van Dam RM, Li T, Spiegelman D, Franco OH, Hu FB. Combined impact of lifestyle factors on mortality: prospective cohort study in US women. *BMJ* 2008;337:a1440.
- [13] Fleming P, Godwin M. Lifestyle interventions in primary care: systematic review of randomized controlled trials. *Can Fam Physician* 2008;54:1706–13.
- [14] Herder C, Peltonen M, Koenig W, Sutfels K, Lindstrom J, Martin S, et al. Anti-inflammatory effect of lifestyle changes in the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia* 2009;52:433–42.
- [15] Maruthur NM, Wang NY, Appel LJ. Lifestyle interventions reduce coronary heart disease risk: results from the PREMIER Trial. *Circulation* 2009;119:2026–31.
- [16] Tonstad S, Sundfor T, Seljeflot I. Effect of lifestyle changes on atherogenic lipids and endothelial cell adhesion molecules in young adults with familial premature coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2005;95:1187–91.
- [17] Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, et al. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1760–71.
- [18] Adult Treatment Panel III. National cholesterol education program. National Heart, Lung and Blood Institute. National Institutes of Health. NIH Publication No. 025215; 2002.
- [19] Elosua R, Garcia M, Aguilar A, Molina L, Covas MI, Marrugat J. Validation of the minnesota leisure time physical activity questionnaire in spanish women. Investigators of the MAR-ATDON group. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:1431–7.
- [20] DiClemente CC, Prochaska JO, Fairhurst SK, Velicer WF, Velasquez MM, Rossi JS. The process of smoking cessation: an analysis of precontemplation, contemplation, and preparation stages of change. *J Consult Clin Psychol* 1991;59:295–304.
- [21] Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr* 2008;21:93–111 [quiz 89–90].
- [22] Rallidis LS, Lekakis J, Kolomvotsou A, Zampelas A, Vamvakou G, Efstathiou S, et al. Close adherence to a Mediterranean diet improves endothelial function in subjects with abdominal obesity. *Am J Clin Nutr*; 2009.
- [23] Poredos P, Orehek M, Tratnik E. Smoking is associated with dose-related increase of intima-media thickness and endothelial dysfunction. *Angiology* 1999;50:201–8.
- [24] Di Francescomarino S, Sciartilli A, Di Valerio V, Di Baldassarre A, Gallina S. The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Med* 2009;39:797–812.
- [25] Wendel-Vos GC, Dutman AE, Verschuren WM, Ronckers ET, Ament A, van Assema P, et al. Lifestyle factors of a five-year community-intervention program: the Hartslag Limburg intervention. *Am J Prev Med* 2009;37:50–6.
- [26] Wood DA, Kotseva K, Connolly S, Jennings C, Mead A, Jones J, et al. Nurse-coordinated multidisciplinary, family-based cardiovascular disease prevention programme (EUROACTION) for patients with coronary heart disease and asymptomatic individuals at high risk of cardiovascular disease: a paired, cluster-randomised controlled trial. *Lancet* 2008;371:1999–2012.
- [27] Yannakoulia M, Poulia KA, Mylona E, Kontogianni MD. Effectiveness of an intensive nutritional intervention in patients with type 2 diabetes mellitus: results from a pilot study. *Rev Diabet Stud* 2007;4:226–30.
- [28] Eriksson MK, Franks PW, Eliasson M. A 3-year randomized trial of lifestyle intervention for cardiovascular risk reduction in the primary care setting: the Swedish Bjorknas study. *PLoS One* 2009;4:e5195.
- [29] Aadahl M, von Huth Smith L, Pisinger C, Toft UN, Glumer C, Borch-Johnsen K, et al. Five-year change in physical activity is associated with changes in cardiovascular disease risk factors. The Inter99 study. *Prev Med*; 2009.
- [30] Anderssen SA, Hjelstuen AK, Hjermann I, Bjerkan K, Holme I. Fluvastatin and lifestyle modification for reduction of carotid intima-media thickness and left ventricular mass progression in drug-treated hypertensives. *Atherosclerosis* 2005;178:387–97.
- [31] Buil-Cosiales P, Irimia P, Berrade N, Garcia-Arellano A, Riverol M, Murie-Fernandez M, et al. Carotid intima-media thickness is inversely associated with olive oil consumption. *Atherosclerosis* 2008;196:742–8.
- [32] Kadoglou NP, Iliadis F, Liapis CD. Exercise and carotid atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;35:264–72.
- [33] Puranik R, Celermajer DS. Smoking and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* 2003;45:443–58.
- [34] Halcox JP, Donald AE, Ellins E, Witte DR, Shipley MJ, Brunner EJ, et al. Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness. *Circulation* 2009;119:1005–12.

## 3er Objectiu



**3<sup>er</sup> Objectiu. Relacionar la reactivitat hiperèmica de les artèries de petita mida amb biomarcadors a sèrum de funció endotel·lial.**

- E. Estudi de la associació de la reactivitat hiperèmica en 407 individus amb marcadors de funció endotel·lial i d'oxidació.
- F. Estudi dels nivells de FABP4 en la diabetis mellitus tipus 2 en comparació amb pacients no diabètics i la seva relació amb la reactivitat hiperèmica.

**Articles.**

Aragonès G, Ferré R, Girona J, Plana N, Merino J, Heras M, Masana L. Small artery dilation and endothelial markers in cardiovascular risk patients. Eur J Clin Invest. 2011 Jun 1. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02553.x.

Aragonès G, Ferré R, Lázaro I, Cabré A, Plana N, Merino J, Heras M, Girona J, Masana L. Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. Atherosclerosis. 2010 Nov;213(1):329-31.





---

## 7.5. Estudi E

Títol: *Small artery dilation and endothelial markers in cardiovascular risk patients.*

Eur J Clin Invest. 2011 Jun 1. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02553.x.

**Objectiu:** L'ús de mètodes basats en la hiperèmia reactiva d'artèries de mida petita està en creixement, tanmateix els mecanismes que regulen la funció vascular d'artèries de mida petita i de les grans artèries són probablement diferents. Aquest treball estudia les correlacions entre la hiperèmia reactiva d'artèries perifèriques petites avaluada per tonometria arterial perifèrica i els nivells de biomarcadors de funció endotel·lial, inflamació i oxidació a sèrum de pacients amb factors de risc cardiovascular.

**Mètodes:** Es van incloure 407 voluntaris amb risc cardiovascular moderat en un estudi transversal per avaluar la relació de l'índex d'hiperèmia reactiva determinada per tonometria arterial perifèrica amb biomarcadors solubles de la funció endotel·lial, inflamació i oxidació.

**Resultats:** S'observà una correlació significativa entre l'índex d'hiperèmia reactiva i les concentracions de selectina-E i VCAM-1. Aquesta correlació va ser més intensa quan s'analitzaren només aquells pacients sense síndrome metabòlica. En aquest subgrup, la relació LDLox/LDL també es correlacionà amb la hiperèmia reactiva. L'anàlisi multivariant mostrà que la selectina-E és l'únic bio marcadore associat a l'índex d'hiperèmia reactiva quan s'ajusta pels possibles factors de confusió.

**Conclusió:** Els nivells elevats de selectina-E, i en menor grau, els de VCAM-1 i LDLox/LDL estan associats a una menor reactivitat hiperèmica post-isquèmia de les artèries perifèriques de mida petita. La selectina-E és el principal marcadore biològic determinant de la reactivitat hiperèmica en l'anàlisi de regressió. La presència de múltiples factors de risc debilita aquesta associació.



# Small artery dilation and endothelial markers in cardiovascular risk patients

Gemma Aragonès, Raimon Ferré, Josefa Girona, Núria Plana, Jordi Merino, Mercedes Heras and Lluís Masana

Internal Medicine Department, Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Universitat Rovira i Virgili, Sant Joan University Hospital, IISPV. Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Reus, Spain

## ABSTRACT

**Background** The use of methods based on reactive hyperaemia of small distal arteries to assess endothelial function (EF) is increasing; however, the mechanisms regulating vascular function in large and small arteries are probably different. We studied the correlations between the hyperaemia reactivity of small peripheral arteries determined by peripheral artery tonometry (PAT) and the levels of serum biomarkers of EF, inflammation and oxidation in patients with cardiovascular (CV) risk factors.

**Methods** Four hundred and seven patients with intermediate CV risk were recruited into a cross-sectional study to examine whether soluble endothelial, inflammatory and lipid oxidative biomarkers correlate with small artery reactive hyperaemia index (saRHI) values, which were measured by PAT.

**Results** A significant correlation was found between saRHI values and the concentrations of soluble E-selectin (sE-selectin) and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1). These correlations were stronger when only non-metabolic syndrome patients (46%) were analysed ( $r = -0.310$ ,  $P < 0.0001$ ;  $r = -0.264$ ,  $P < 0.0001$ , respectively). In this subgroup, the oxidised low-density lipoprotein/LDL (oxLDL/LDL) was also correlated with saRHI ( $r = -0.193$ ,  $P = 0.009$ ). A stepwise regression study showed that sE-selectin was the only biomarker significantly correlated with saRHI values ( $P < 0.0001$ ). In multivariate linear regression analysis, this relationship was still strong when the main confounding covariates were taken into consideration.

**Conclusions** Elevated levels of sE-selectin and, to a smaller degree, sVCAM-1 and oxLDL/LDL are associated with lower postischemic reactivity in the small distal arteries. sE-selectin is the main determinant biomarker of saRHI as assessed by regression analysis. The presence of multiple risk factors weakens this association.

**Keywords** Cardiovascular risk, endothelial function, E-selectin, peripheral artery tonometry, reactive hyperaemia index, small arteries.

Eur J Clin Invest 2011

## Introduction

Endothelial dysfunction is considered to be one of the main contributors to the development of atherosclerosis [1]. It has been observed in patients with cardiovascular risk factors such as dyslipidaemia, hypertension, diabetes, smoking, metabolic syndrome and obesity [2]. Despite the strong body of evidence linking endothelial dysfunction to increased cardiovascular risk, it is still uncommon to assess endothelial dysfunction at the clinical level [3]. There are several approaches to appraising endothelial function (EF). It is most often assessed using biomarkers and imaging systems. High plasma concentrations of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), interleukin-6

(IL-6), tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and high-sensitivity C-reactive protein (HsCRP) have been associated with endothelial dysfunction and increased cardiovascular risk (CVR) [4,5]. However, these associations have added little to the classical cardiovascular risk assessment methods [6]. Among the noninvasive imaging systems, sonographic measurement of flow-mediated dilation (FMD) in the brachial arteries before and after ischaemia has been widely used [7]. FMD has been associated with classical CVR factors and predicts the risk of a cardiovascular (CV) event [8]. Despite robust results in clinical studies under laboratory-like conditions, this method is not widely used in everyday individual clinical practice because the

(patho)physiological endothelial function differs greatly between individuals, and thus, the image analysis and the interpretation of the results require standardisation and extensive experience.

In the last years, several alternative, less operator-dependent methods have been developed to assess the EF in clinical settings. Among them, peripheral artery tonometry (PAT) of small distal arteries appears to be highly promising. PAT is a noninvasive, highly reproducible and less operator-dependent technique based on the pulse wave amplitude (PWA) variations of the digital arteries before and after ischaemia. These measurements are referred to as the small artery reactive hyperaemia index (saRHI). The degree to which the saRHI depicts the EF derangements of larger arteries is unclear. The mechanisms regulating the function of large and small arteries are probably different and are relatively unknown for the smaller vessels. On the other hand, the study of the function of small arteries *per se* is of great clinical interest because of their relevant clinical significance on ischemic processes, such as nephropathy, retinopathy, small vessel brain ischaemia and peripheral resistance regulation.

The PAT method has been shown to predict alterations in the coronary dilation mediated by Ach [9]. The correlation with brachial artery FMD has also been studied with divergent results [10,11]. It has been shown to correlate with the Framingham risk score (FRS) in a general-population-based study [12]. The clinical event predictive capacity of PAT values has recently been reported [13]. Our group has shown that saRHI is influenced by smoking, waist circumference and lipid alterations [14]; furthermore, saRHI predicts intima media thickness progression in a cohort of patients with elevated CVR [15]. We have also shown that low saRHI values are associated with markers of metabolic alterations in patients with diabetes [16]. Other studies have shown that saRHI is controlled by nitric oxide (NO) production [17]. However, the relationship between the saRHI values of distal small arteries and the biomarkers of EF, inflammation mediators and oxidation parameters have not yet been studied. In this work, we report that saRHI values correlate with several EF, inflammation and lipid oxidation markers in patients with intermediate cardiovascular risk.

## Patients and methods

### Study subjects

We studied 407 male and female patients aged 22–80 years with no evidence of cardiovascular disease with low–intermediate global cardiovascular risk (5–20% at 10 years according to the Framingham risk score, FRS). These patients were enrolled at the Vascular Medicine and Metabolism Unit of the Sant Joan University Hospital in Reus, Spain. The ATPIII criteria were

used to define the presence of metabolic syndrome (MS). Patients with the following conditions were not included: prior coronary heart disease (CHD); cerebral or peripheral vascular disease; and cancer, hepatic, renal, lung, endocrine or inflammatory chronic diseases. A complete physical examination, anthropometry and CVR assessment were performed on each participant. Vascular function was assessed at the same session before obtaining a blood sample. The studies were performed while the patients were undergoing therapy to control CVR factors when required according to hospital protocols. The study was approved by the Ethical and Clinical Investigation Committee of the hospital, and all participants signed written informed consent forms.

### Biochemical and biomarker determinations

Venous blood samples were obtained after a 12-h overnight fasting period, centrifuged immediately and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the assays were performed. Cholesterol, triglycerides, glucose, direct low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and hs-CRP levels were measured using enzymatic and immunoturbidimetric assays (Spinreact SA, Barcelona, Spain) adapted for the Cobas Mira Plus autoanalyser (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain).

### Human cytokine antibody array: sVCAM-1, sICAM-1, sE-Selectin, TNF $\alpha$ and IL-6

Differential expression of inflammatory cytokines was determined using the Human Cytokine Antibody Array (RayBiotech, Norcross, GA, USA). The array is coated with six specific cytokine antibodies. It was probed with serum samples to allow for the comparisons of relative cytokine levels. The cytokine-antibody–biotin complex can be visualised with the addition of a streptavidin-labelled fluorescent dye using a laser scanner. The results are shown in  $\text{ng mL}^{-1}$  for sVCAM-1, sICAM-1 and sE-Selectin and in  $\text{pg mL}^{-1}$  for TNF $\alpha$  and IL-6. The mean inter- and intra-assay coefficients of variation for the biomarkers were  $< 12\%$  and  $< 10\%$ , respectively.

### Measurement of oxLDL

We used the Mercodia Oxidized LDL ELISA, a solid-phase two-site enzyme immunoassay (Mercodia AB, Uppsala, Sweden), to quantitatively measure oxidised low-density lipoproteins (oxLDL) in plasma. The results were obtained as  $\text{U L}^{-1}$  and expressed as the oxLDL/LDL cholesterol ratio ( $\text{U mmol}^{-1}$ ). The performance characteristics for this assay were 6.3% intra-assay and 4.7% interassay.

### Measurement of antibodies against oxLDL

We used enzyme immunoassay IMTEC-ox-LDL-antibodies (IMTEC Immunodiagnostika GmbH, Berlin, Germany) to quantitatively measure anti-oxLDL antibodies in plasma. The

results are expressed as  $U\text{ mL}^{-1}$ . The performance characteristics for this assay were 7.8% intra-assay and 8.6% interassay.

### Small artery reactivity assessment

The small artery reactivity to postischaemic hyperaemia was used as a representative of endothelial function. It was measured using the EndoPAT-2000 (Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel). Determinations were performed in patients in a temperature-controlled room (22–24 °C) after a 12-h fasting period and 24 h of refraining from smoking and strenuous exercise. The patients were lying in a relaxed, quiet, diffusely illuminated environment. We compared the blood flow of two fingertips, one on each hand, before and after 5 min of brachial ischaemia in one of the arms (test arm). Small artery reactive hyperaemia index was obtained by comparing the dilation of the test (before and after ischaemia) and control arms. The value obtained is referred to as the saRHI.

### Statistics

All data were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test. Continuous variables are presented as the mean  $\pm$  SD for normally distributed data, the median (25th percentile – 75th percentile) for non-normally distributed data and the frequencies (*n*) or percentages (%) for categorical variables. Variables with a non-normal distribution were log transformed for further analysis. Univariate association was tested by Pearson correlation analysis. Differences between patient subgroups were tested by one-way analysis of variance (ANOVA). The predictors for stepwise regression analysis were selected on the basis of correlation analysis and from the variables known to be associated with the dependent variable according our previous results [14]. Linear regression was used to characterise the relationship between saRHI and sE-selectin. Age, gender, body mass index, ratio of total to HDL cholesterol, triglycerides, diabetes mellitus, smoking status and current usage of hypolipemiant and antihypertensive drugs were included as covariates. The covariates were again selected on the basis of correlation analysis and from the variables known to be associated with the dependent variable [14]. Analyses were performed using SPSS (Version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

Reporting of the study conforms to STROBE along with references to STROBE and the broader EQUATOR guidelines (Simera *et al.* January 2010 issue of EJCI).

### Results

The clinical, metabolic, biochemical and vascular function parameters regarding the gender status of the 407 patients are summarised in Table 1.

We observed a significant inverse correlation between saRHI and sE-selectin and sVCAM-1 in the entire group (Table 2). After adjusting the saRHI for age, gender, body mass index (BMI), smoking status and lipid-lowering treatment, the correlation between sE-selectin and sVCAM-1 levels remained statistically significant ( $r = -0.162$ ,  $P = 0.002$  and  $r = -0.101$ ,  $P = 0.05$ , respectively). When patients were divided into non-MS and MS groups, the association between saRHI and plasma biomarkers (sE-selectin, sVCAM-1) was stronger in the non-MS group. In this subgroup, oxLDL/LDL levels and saRHI were also statistically correlated (Table 2). Table 3 shows prevalence of metabolic syndrome components, other risk factors and endothelial, inflammatory and oxidative biomarkers in patients above and below saRHI mean. FRS and saRHI were not correlated in our study ( $r = 0.060$ ,  $P = 0.231$ ).

In a stepwise linear regression model, along with smoking and triglycerides, sE-selectin was the only endothelial biomarker determinant of the saRHI values (Table 4). To further explore the relationship between sE-selectin and saRHI, a linear regression model was performed. The significant inverse relationship between sE-selectin and saRHI observed remained robust with additional adjustment for covariates: age, gender, body mass index, ratio of total to HDL cholesterol, triglycerides, diabetes mellitus, smoking status and current usage of hypolipemiant and antihypertensive drugs (Table 5).

When the interaction effects of sE-selectin with smoking and triglycerides were forced into the model, no significant effects on the overall saRHI values were observed.

### Discussion

We analysed the correlation between blood markers of EF, inflammation, lipid oxidation and saRHI. sE-selectin and, to a smaller degree, VCAM-1 and oxLDL/LDL were associated with small artery reactivity. Among these markers, sE-selectin was the only one associated with saRHI in the regression analyses. This concordance was still strong after adjusting for covariates. These correlations were not modified by lipid-lowering treatment.

saRHI can be considered a surrogated marker of EF and seems to be a reliable method for the implementation of endothelial function assessment at the clinical level [18]. saRHI appears to be superior to brachial FMD in terms of clinical applicability because it is less observer-dependent; it can be performed by trained auxiliary personal and can be easily implemented at clinical setting. However, it is a rather expensive method. The concordance between FMD evaluated in the larger brachial arteries and in the small digital arteries is under discussion. A good correlation between both measurements in patients with stable coronary vascular disease was observed [10], but a recent larger general-population-

**Table 1** Clinical, metabolic, biochemical and vascular function parameters regarding gender status

Characteristic	All patients (n = 407)	Male (n = 292)	Female (n = 115)	P level
Age, years	56.94 ± 10.46	56.28 ± 10.12	58.63 ± 11.16	0.042
Systolic blood pressure, mmHg	135.00 (125.00–145.00)	135.00 (125.00–146.00)	130.00 (120.00–142.00)	0.054
Diastolic blood pressure, mmHg	80.00 (80.00–90.00)	80.00 (80.00–90.00)	80.00 (80.00–90.00)	0.707
Body mass index, kg m <sup>-2</sup>	31.16 ± 4.29	31.11 ± 4.02	31.30 ± 4.91	0.691
Total cholesterol, mM	5.18 ± 1.41	5.06 ± 1.34	5.49 ± 1.53	0.005
Triglycerides, mM	1.94 (1.30–3.07)	2.06 (1.33–3.10)	1.74(1.19–2.87)	0.106
LDL, mM	3.17 ± 0.95	3.09 ± 0.90	3.35 ± 1.05	0.015
HDL, mM	1.37 ± 0.29	1.30 ± 0.25	1.55 ± 0.32	< 0.0001
Glucose, mM	5.98 (5.39–7.73)	6.03 (5.42–7.91)	5.91 (5.25–7.45)	0.174
Framingham risk score, %	11.5 ± 6.76	12.94 ± 6.88	7.85 ± 4.78	< 0.0001
Diabetes mellitus, %	39.3	40.1	37.4	0.619
Smoking, %	35.6	40.8	22.6	0.001
Hypertension, %	58.7	57.2	62.6	0.318
Metabolic syndrome, %	54.5	52.4	60.0	0.165
Currently taking hypolipemiant drugs, % (95% statins)	70.3	73.7	62.5	0.068
Currently taking antiaggregant drugs, %	18.4	22.0	10.0	0.020
Currently taking oral hypoglycaemic drugs, %	30.8	30.1	32.5	0.698
Currently taking antihypertensive drugs, %	45.9	45.2	47.5	0.726
saRHI	1.58 (1.45 – 1.82)	1.56 (1.45–1.79)	1.62 (1.44–1.86)	0.080
sICAM-1, ng mL <sup>-1</sup>	86.19 (28.90–224.20)	90.94 (32.11–239.21)	59.97 (19.58–158.07)	0.027
sVCAM-1, ng mL <sup>-1</sup>	972.18 (592.80–1309.33)	985.66 (628.79–1306.95)	874.32 (542.16–1331.19)	0.119
sE-selectin, ng mL <sup>-1</sup>	35.65 (21.19–51.12)	32.90 (20.22–51.93)	37.40 (25.51–50.87)	0.280
IL-6, pg mL <sup>-1</sup>	48.69 (24.00–156.21)	43.95 (24.00–128.92)	83.08 (24.00–225.99)	0.001
TNF $\alpha$ , pg mL <sup>-1</sup>	174.10 (27.55–657.04)	147.49 (25.99–550.44)	242.08 (50.12–922.97)	0.014
HsCRP, mg mL <sup>-1</sup>	1.42 (0.71–3.65)	1.29 (0.67–3.06)	1.92 (0.84–4.48)	0.053
oxLDL-Ab, U mL <sup>-1</sup>	16.03 (14.02–18.86)	15.86 (13.82–18.15)	16.78 (24.25–20.64)	0.144
oxLDL/LDL, U mmol <sup>-1</sup>	58.67 (45.96–74.37)	61.13 (48.58 – 75.88)	52.21 (41.71–68.23)	0.012

LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; saRHI, small artery reactive hyperaemia index; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule 1; sVCAM-1, soluble vascular adhesion molecule; sE-selectin, soluble E-selectin; IL-6, interleukin 6; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ ; HsCRP, Hs C-reactive protein; oxLDL/LDL, oxidised low-density lipoprotein/LDL; Ab oxLDL, oxidised low-density lipoprotein antibodies.

Normally distributed data presented as mean  $\pm$  SD or percentage of patients. Non-normally distributed data are presented as the median (25th percentile – 75th percentile). P level: the difference regarding gender using one-way ANOVA.

**Table 2** Correlations between saRHI values and endothelial, inflammatory and oxidative biomarkers regarding metabolic syndrome status

Log(saRHI)	All patients (n = 407)		Non-MS (n = 185)		MS (n = 222)	
	r	P level	r	P level	r	P level
Log(sE-selectin)	-0.184	< 0.0001	-0.310	< 0.0001	-0.043	0.526
Log(sVCAM-1)	-0.119	0.018	-0.264	< 0.0001	0.010	0.882
Log(sICAM-1)	0.064	0.211	0.044	0.562	0.078	0.257
Log(IL6)	0.032	0.530	0.049	0.520	0.006	0.928
Log(TNF $\alpha$ )	-0.026	0.608	-0.069	0.364	0.004	0.956
Log(HsCRP)	-0.016	0.749	0.005	0.945	0.007	0.912
Log(oxLDL/LDL)	-0.079	0.115	-0.193	0.009	0.023	0.740
Log(oxLDL-Ab)	0.051	0.314	0.011	0.886	0.107	0.121

saRHI, small arteries reactive hyperaemia index; sE-selectin, soluble E-selectin; sVCAM-1, soluble vascular adhesion molecule 1; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule 1; IL-6, interleukin 6; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ ; HsCRP, Hs C-reactive protein; oxLDL/LDL, oxidised low-density lipoprotein/LDL; oxLDL-Ab, oxidised low-density lipoprotein antibodies; MS, metabolic syndrome.

Variables were log transformed. Univariate association was tested by Pearson correlation analysis.

based study shows a weak correlation between both methods, suggesting that they evaluate different aspects of vascular reactivity [11]. The mechanisms regulating vascular function in the small and large vessels are probably different. Nevertheless, some similarities at the pathophysiological level have already been described. For instance, it has been shown that the postischemic reactivity of small arteries is mediated by NO release [17].

Interestingly, in our study, the significant associations were restricted to the non-metabolic syndrome patients, suggesting that other factors associated with lipid or glucose metabolism, blood pressure or obesity modulate the observed concordances. In a larger group of patients, we have already reported that HDL, triglycerides and smoking have an important influence on saRHI [14]. The saRHI was associated neither to metabolic syndrome components nor to FRS. In the group with saRHI below 1.7, less hypertension and more smoking patients were observed. Similar results have been obtained by our group in a larger population [14] and by Hamburg *et al.* in the Framingham cohort [12]. On the other hand, a stronger association between sE-selectin and saRHI in patients with fewer CV risk factors supports the role of sE-selectin in the physiological function of small arteries endothelium [18]. Previous results have shown that sE-selectin is also the adhesion molecule that correlates most with FMD in healthy subjects [19], which reinforces our results.

We also showed for the first time that impaired endothelial function assessed by saRHI is associated with high levels of sVCAM-1 in patients with CVR, in accordance with animal

model studies [20]. We did not find a correlation between ICAM and saRHI values, while recent studies have shown a negative correlation in healthy adolescents [21] and between ICAM and FMD in patients with hypercholesterolaemia[22]. We did not encounter an association between saRHI values and inflammatory mediators, such as hsCRP, IL-6 or TNF $\alpha$ , which are classically associated with endothelial dysfunction. The reasons for these discrepancies could be due to dissimilarities in the studied populations and the different prevalence of CV risk factors.

We observed a significantly increased level of oxLDL/LDL in patients with lower saRHI values; moreover, the oxLDL/LDL ratio was also correlated with saRHI in patients with fewer CV risk factors. This finding is in accordance with previous studies that have demonstrated a relationship between oxLDL and EF [23,24]. Our work extends this observation to small peripheral arteries.

Some limitations of our study are as follows. First, this work is an associative study; thus, we can only suggest causal explanations for our results. Second, we do not provide data in parallel with more established methods to evaluate EF as brachial FMD; thus, this report cannot be considered to be a saRHI validation study for clinical implementation. Third, our patients were in treatment. Although we cannot exclude the influence of drugs on our results, our statistical analyses did account for drug treatment, and the main pharmacological groups did not influence the overall results. On the other hand, our study design provided information during therapy, which could be considered important given that this is the usual clinical situation.

**Table 3** Clinical, metabolic, endothelial, inflammatory and oxidative parameters according to saRHI values

	saRHI < 1.70 n = 249	saRHI ≥ 1.70 n = 146	P level
Metabolic syndrome criteria*			
High waist circumference, %	65.1	70.8	0.241
Low HDL, %	13.4	7.5	0.073
High triglycerides, %	63.1	57.5	0.272
High blood pressure, %	65.8	84.2	< 0.001
High glucose, %	47.9	50.7	0.589
Smoking, %	39.8	28.1	0.017
Framingham risk score, %	11.13 ± 6.71	12.16 ± 6.83	0.139
sICAM-1, ng mL <sup>-1</sup>	87.15 (25.31–240.21)	83.80 (38.22–186.27)	0.492
sVCAM-1, ng mL <sup>-1</sup>	1017.42 (627.35–1343.49)	924.08 (469.85–1258.26)	0.023
sE-selectin, ng mL <sup>-1</sup>	38.00 (23.04–53.27)	32.75 (17.41–46.09)	< 0.0001
IL-6, pg mL <sup>-1</sup>	50.11 (24.00–152.59)	48.32 (24.00–162.85)	0.942
TNFα, pg mL <sup>-1</sup>	214.20 (32.65–637.19)	147.86 (24.00–685.89)	0.570
HsCRP, mg mL <sup>-1</sup>	1.38 (0.72–3.07)	1.49 (0.69–4.39)	0.521
oxLDL-Ab, U mL <sup>-1</sup>	16.21 (13.86–18.69)	15.94 (14.05–19.86)	0.285
oxLDL/LDL, U mmol <sup>-1</sup>	60.62 (47.82–76.23)	54.49 (43.93–69.34)	0.048

saRHI, small arteries reactive hyperaemia index; HDL, high-density lipoprotein; sE-selectin, soluble E-selectin; sVCAM-1, soluble vascular adhesion molecule 1; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule 1; IL-6, interleukin 6; TNFα, tumour necrosis factor α; HsCRP, Hs C-reactive protein; oxLDL/LDL, oxidised low-density lipoprotein/LDL; oxLDL-Ab, oxidised low-density lipoprotein antibodies.

\*Metabolic syndrome status according to ATP III criteria.

Normally distributed data presented as mean ± SD or percentage of patients. Non-normally distributed data are presented as the median (25th percentile – 75th percentile). The saRHI mean value (1.70) was used as a cut-off point. P-values: the differences between saRHI groups were tested by one-way ANOVA.

Our study shows that the reactivity of small peripheral arteries to ischaemia is associated with sE-selectin levels and, to a smaller degree, VCAM-1 and lipid oxidation, which are common vascular function mediators to other vascular beds. These results suggest that the study of saRHI would identify patients at increased cardiovascular risk.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from the ISCIII, Madrid, Spain (PI 05/1954, FEDER). CIBER in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación), Spain.

#### Conflict of interest

The authors of the manuscript declare no conflicts of interest.

#### Contributions

Gemma Aragonès was responsible for the study design and finalised the report; Raimon Ferré contributed to data

**Table 4** Stepwise regression analyses for saRHI

	B	P level	R <sup>2</sup> change (%)
Smoking	-0.039	0.002	5.2
Log(sE-selectin)	-0.039	0.004	3.7
Log(triglycerides)	-0.038	0.049	1.4

HDL, high-density lipoprotein.

Stepwise regression analyses of 407 patients. R<sup>2</sup> = 0.104, P < 0.0001.

Variables entered in the model: Log(sE-selectin), age, gender, body mass index, ratio of total to HDL cholesterol, Log(triglycerides), diabetes mellitus, smoking status, current usage of hypolipemiant drugs and current usage of antihypertensive drugs.

interpretation and drafted the report; Josefa Girona contributed to data interpretation and drafted the report; Núria Plana participated in patient selection and drafted the report; Jordi Merino participated in patient selection and technical analysis; Mercedes Heras performed the general biochemical determinations; and Lluís Masana participated in the overall design.



**Table 5** Beta Coefficients for the Association between saRHI and sE-selectin

Linear regression covariates	B	P level	R <sup>2</sup> change (%)
Raw Model	-0.045	0.001	4.2
Model 1			
Age and gender	-0.042	0.003	3.6
Model 2			
Age, gender and body mass index	-0.041	0.004	0.4
Model 3			
Age, gender, body mass index, ratio of total to HDL cholesterol and triglycerides	-0.038	0.007	1.8
Model 4			
Age, gender, body mass index, ratio of total to HDL cholesterol, triglycerides, diabetes and smoking	-0.037	0.008	2.9
Model 5			
Age, gender, body mass index, ratio of total to HDL cholesterol, triglycerides, diabetes, smoking, hypolipemiant drugs and antihypertension drugs	-0.037	0.007	2.2

HDL, high-density lipoprotein.

Linear regression analyses of 407 patients.

Covariates entered in the model: age, gender, body mass index, ratio of total to HDL cholesterol, triglycerides, diabetes, smoking, hypolipemiant drugs and antihypertension drugs.

### Address

Internal Medicine Department, Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Universitat Rovira i Virgili, Sant Joan University Hospital, IISPV. Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Reus, Spain (G. Aragonès, R. Ferré, J. Girona, N. Plana, J. Merino, M. Heras, L. Masana).

**Correspondence to:** Lluís Masana, MD, PhD, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Universitat Rovira i Virgili. C. Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain. Tel.: +34 977759366; fax: +34 977759322; e-mail: luis.masana@urv.cat

Received 9 December 2010; accepted 11 May 2011

### References

- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**352**:1685–95.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;**115**:1285–95.
- Ter Avest E, Stalenhoef AF, de Graaf J. What is the role of non-invasive measurements of atherosclerosis in individual cardiovascular risk prediction? *Clin Sci (Lond)* 2007;**112**:507–16.
- Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr *et al.* Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997;**96**:4219–25.
- Jin C, Lu L, Zhang RY, Zhang Q, Ding FH, Chen QJ *et al.* Association of serum glycated albumin, C-reactive protein and ICAM-1 levels with diffuse coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2009;**408**:45–9.
- Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M *et al.* Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet* 2001;**358**:971–6.
- Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007;**115**:2390–7.
- Vita JA, Keane JF Jr, Larson MG, Keyes MJ, Massaro JM, Lipinska I *et al.* Brachial artery vasodilator function and systemic inflammation in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 2004;**110**:3604–9.
- Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;**44**:2137–41.
- Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Scheffy J, Schnall RP *et al.* Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;**146**:168–74.
- Hamburg NM, Palmisano J, Larson MG, Sullivan LM, Lehman BT, Vasani RS *et al.* Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community. *Hypertension* 2011;**57**:390–96.
- Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasani RS, Schnabel R, Pryde MM *et al.* Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;**117**:2467–74.
- Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE *et al.* Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010;**31**:1142–8.

- 14 Ferre R, Aragonès G, Plana N, Merino J, Heras M, Buixadera C *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1 levels strongly influence the reactivity of small peripheral arteries. *Atherosclerosis* 2011;**216**:115–9.
- 15 Ferre R, Plana N, Merino J, Aragonès G, Girona J, Heras M *et al.* Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; doi:10.1016/j.numecd.2010.04.008 [Epub ahead of print].
- 16 Aragonès G, Ferre R, Lazaro I, Cabre A, Plana N, Merino J *et al.* Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2010;**213**:329–31.
- 17 Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* 2006;**101**:545–8.
- 18 Gimbrone MA Jr, Bevilacqua MP, Cybulsky MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1990;**598**:77–85.
- 19 Eschen O, Christensen JH, Dethlefsen C, Schmidt EB. Cellular adhesion molecules in healthy subjects: short term variations and relations to flow mediated dilation. *Biomark Insights* 2008;**3**:57–62.
- 20 Zhang R, Jia G, Bao J, Zhang Y, Bai Y, Lin L *et al.* Increased vascular cell adhesion molecule-1 was associated with impaired endothelium-dependent relaxation of cerebral and carotid arteries in simulated microgravity rats. *J Physiol Sci* 2008;**58**:67–73.
- 21 Chen Y, Osika W, Dangardt F, Gan LM, Strandvik B, Friberg P. High levels of soluble intercellular adhesion molecule-1, insulin resistance and saturated fatty acids are associated with endothelial dysfunction in healthy adolescents. *Atherosclerosis* 2010;**211**:638–42.
- 22 Nawawi H, Osman NS, Annuar R, Khalid BA, Yusoff K. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolemia treated with atorvastatin. *Atherosclerosis* 2003;**169**:283–91.
- 23 Paniagua JA, Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Vida JM, Fuentes F *et al.* Oxidized-LDL levels are changed during short-term serum glucose variations and lowered with statin treatment in early Type 2 diabetes: a study of endothelial function and microalbuminuria. *Diabet Med* 2005;**22**:1647–56.
- 24 van der Zwan LP, Teerlink T, Dekker JM, Henry RM, Stehouwer CD, Jakobs C *et al.* Circulating oxidized LDL: determinants and association with brachial flow-mediated dilation. *J Lipid Res* 2009;**50**:342–9.

## 7.6. Estudi F

*Títol: Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes.*

Atherosclerosis. 2010 Nov;213(1):329-31.

**Objectiu:** Els nivells plasmàtics de FBAP4 estan elevats en la diabetis mellitus tipus 2. La disfunció endotel·lial en la diabetis mellitus tipus 2 és freqüent. Aquest estudi avalua la relació entre els nivells circulants de FABP4 i un marcador indirecte de funció endotel·lial, la hiperèmia reactiva digital.

**Mètodes:** A 257 voluntaris, 105 diabètics i 152 no diabètics, amb risc cardiovascular incrementat, es mesuraren els nivells de FABP4 circulant, l'índex de reactivitat hiperèmica per tonometria arterial perifèrica, el gruix íntima-mitja carotí i marcadors biològics d'inflamació, oxidació i funció endotel·lial.

**Resultats:** En els pacients amb diabetis mellitus tipus 2 s'observà que la FABP4 circulant s'associà de forma negativa amb la funció endotel·lial segons l'índex d'hiperèmia reactiva. En el model de regressió lineal, la FABP4 circulant fou un predictor de l'índex d'hiperèmia reactiva en els pacients diabètics.

**Conclusió:** Els nivells plasmàtics de FABP4 s'associen de forma inversa amb la funció endotel·lial mesurada per tonometria arterial perifèrica de pacients amb diabetis mellitus tipus 2. Es suggereix un efecte directe de la FABP4 circulant sobre l'endoteli vascular dels individus amb diabetis mellitus tipus 2.

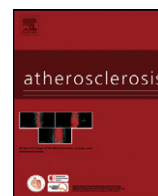




Contents lists available at ScienceDirect

## Atherosclerosis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/atherosclerosis](http://www.elsevier.com/locate/atherosclerosis)



# Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes

Gemma Aragonès, Raimon Ferré, Iolanda Lázaro, Anna Cabré, Núria Plana,  
Jordi Merino, Mercedes Heras, Josefa Girona, Lluís Masana\*

Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Universitat Rovira i Virgili, Internal Medicine Department, Sant Joan University Hospital, IISPV. CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Reus, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 April 2010  
Received in revised form 20 July 2010  
Accepted 20 July 2010  
Available online 27 July 2010

#### Keywords:

FABP4  
Endothelial function  
Type 2 diabetes  
Reactive hyperemia  
Inflammatory markers  
Oxidative markers  
Cardiovascular risk

### ABSTRACT

**Objective:** Adipocyte fatty acid-binding protein (FABP4) plasma levels are higher in type 2 diabetes (T2D). Endothelial dysfunction is also common in T2D. We have investigated the relationship between circulating FABP4 levels and endothelial function in diabetic patients.

**Methods:** In 257 patients (105 diabetic and 152 non-diabetic) at increased risk of cardiovascular disease, we measured circulating FABP4, reactive hyperemia index (RHI) by peripheral artery tonometry, intima-media thickness, and biomarkers of inflammation, oxidation and endothelial function.

**Results:** In T2D subjects, FABP4 was negatively associated with endothelial function, as measured by RHI ( $r = -0.226$ ,  $P = 0.05$ ). In a stepwise multivariate linear regression model, FABP4 was a predictor of RHI in T2D patients ( $P = 0.04$ ).

**Conclusion:** Circulating levels of FABP4 are inversely associated with endothelial function in T2D patients, as measured by RHI. We suggest a direct effect of plasma FABP4 on the vascular endothelium in those with T2D.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The adipose fatty acid-binding protein (FABP), also known as FABP4 and aP2, is one of the best characterised intracellular lipid transport proteins. It is expressed in adipocytes and macrophages [1]. A recent study has shown that FABP4 is expressed in microvascular endothelial cells [2]. It appears to function primarily as a cytoplasmic chaperone of long chain fatty acids; it transports them to other sub-cellular compartments for metabolism, secretion [3] or translocation to the nucleus to regulate the function of transcription factors, such as PPAR $\gamma$  [4]. FABP4 knock-out mice are protected against hyper-insulinemia and insulin resistance induced by obesity [1]. FABP4  $-/-$  mice in an apo E  $-/-$  background show delayed development of arteriosclerotic plaques [1]. FABP4 is also found circulating in plasma; however, neither its secretion pathways nor its functions are known. Our group and others have shown that FABP4 plasma concentrations are increased in patients with obesity, metabolic syndrome (MS), type 2 diabetes (T2D), familial combined hyperlipidemia or lipodystrophy syndromes [5–9]. FABP4 levels have also been associated with the presence of cardio-

vascular disease. However, FABP4's causal role in these processes has not been established. There is indirect evidence that circulating FABP4 could promote inflammation and mediate insulin resistance and atherogenic dyslipidemia; circulating FABP4 has also been associated with carotid intima-media thickness and coronary atheroma [10]. It has recently been demonstrated that FABP4 has a direct impact on myocardial muscle cells by decreasing their contractility [11]. This finding suggests that circulating FABP4 could also have a direct effect on peripheral cells and tissues. One hypothesis is that the elevated FABP4 plasma concentrations observed in patients with obesity, MS and T2D could account for the accelerated arterial damage seen in these conditions. Endothelial dysfunction is a common finding in the above mentioned metabolic diseases. Several factors, such as insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, hyperglycaemia, abdominal obesity and low-grade inflammation, have been associated with endothelial dysfunction in subjects with T2D [12], but the exact cause of this alteration is not clear. Despite the strong evidence relating endothelial dysfunction and cardiovascular risk, an assessment of endothelial function is not usually performed at the clinical level [13], primarily because of technical difficulties. Reactive hyperemia index (RHI), which is measured by peripheral artery tonometry (PAT), is a non-invasive, reproducible and reliable method used to assess endothelial function in clinical settings. In this work, we have explored the relationship between FABP4 plasma levels and endothelial function assessed by RHI in diabetics and non-diabetics at elevated cardiovascular risk.

\* Corresponding author at: Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, Universitat Rovira i Virgili. C. Sant Joan S/N, 43201 Reus, Spain. Tel.: +34 977759366; fax: +34 977759322.  
E-mail address: [luis.masana@urv.cat](mailto:luis.masana@urv.cat) (L. Masana).

**Table 1**  
 Clinical, metabolic, biochemical and vascular function parameters according to diabetes status.

Characteristic	All CVR patients (n = 257)	Non-T2D (n = 152)	T2D (n = 105)	P
Women, %	29.6	28.9	30.5	0.792
Age, years	57.29 ± 10.66	55.38 ± 11.06	60.07 ± 9.44	<0.0001
Systolic blood pressure, mm Hg	137.99 ± 16.88	136.22 ± 14.66	140.55 ± 19.44	0.043
Diastolic blood pressure, mm Hg	83.51 ± 10.72	83.42 ± 11.06	83.63 ± 10.27	0.879
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	31.11 ± 4.41	30.22 ± 4.06	32.43 ± 4.60	<0.0001
Waist circumference, cm	103.83 ± 10.62	101.91 ± 9.72	106.70 ± 11.29	<0.0001
Total cholesterol, mmol/l	5.10 ± 1.13	5.33 ± 1.08	4.77 ± 1.12	<0.0001
Triglycerides, mmol/l	1.89 (1.20–2.97)	1.88 (1.22–2.77)	1.94 (1.11–3.23)	0.596
LDL, mmol/l	3.19 ± 0.94	3.44 ± 0.93	2.84 ± 0.85	<0.0001
HDL, mmol/l	1.40 ± 0.30	1.43 ± 0.30	1.36 ± 0.28	0.061
Glucose, mmol/l	6.80 ± 2.10	5.80 ± 1.18	8.24 ± 2.29	<0.0001
HbA1c, %	6.37 ± 1.16	5.35 ± 0.59	6.74 ± 1.09	<0.0001
Creatinine, μmol/l	84.00 (71.00–93.00)	85.00 (75.00–93.00)	82.50 (70.25–91.75)	0.412
FABP4, ng/ml	26.02 (19.39–7.99)	25.30 (17.77–35.81)	29.22 (21.52–39.64)	0.069
ICAM-1, ng/ml	71.11 (28.50–181.04)	70.20 (28.95–182.85)	78.33 (27.94–175.32)	0.908
VCAM-1, ng/ml	833.34 (394.61–1328.40)	791.24 (339.30–1265.50)	984.86 (459.73–1430.0)	0.082
E-selectin, ng/ml	23.88 (10.77–43.03)	21.01 (9.79–37.96)	27.53 (13.73–48.63)	0.036
IL-6, pg/ml	47.66 (24.00–149.67)	44.91 (24.00–143.89)	53.33 (24.00–155.54)	0.754
TNFα, pg/ml	143.77 (24.00–502.08)	129.31 (24.00–476.25)	158.13 (36.17–549.91)	0.395
HsCRP, mg/l	1.44 (0.76–3.87)	1.33 (0.66–3.42)	1.69 (0.84–4.50)	0.259
Ab ox-LDL, U/ml	16.27 (14.33–19.47)	16.22 (14.51–19.56)	16.31 (14.13–19.14)	0.497
ox-LDL/LDL, U/mmol	56.05 (45.62–68.60)	54.87 (44.29–67.94)	58.02 (47.47–69.75)	0.175
RHI	1.58 (1.45–1.88)	1.58 (1.46–1.89)	1.58 (1.45–1.86)	0.884
CCA mean, mm	0.75 (0.66–0.87)	0.75 (0.66–0.88)	0.75 (0.64–0.86)	0.836
IMT mean, mm	0.79 (0.70–0.88)	0.80 (0.70–0.88)	0.79 (0.70–0.90)	0.847
IMT max, mm	1.10 (0.99–1.25)	1.10 (0.99–1.25)	1.10 (0.96–1.26)	0.920
ABI	1.02 (0.93–1.10)	1.03 (0.94–1.11)	1.01 (0.92–1.08)	0.607

Normally distributed data are presented as mean ± SD or percentage of patients. Non-normally distributed data are presented as the median (25th percentile–75th percentile). P-value: the difference among non-T2D and T2D using one-way ANOVA or Mann–Whitney U-test. Abbreviations: CVR, cardiovascular risk; T2D, type 2 diabetes; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; FABP4, fatty acid-binding protein 4; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule 1; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1; sE-selectin, soluble E-selectin; IL-6, interleukin 6; TNFα, tumor necrosis factor α; HsCRP, Hs C-reactive protein; ox-LDL/LDL, oxidized low-density lipoprotein/LDL; Ab ox-LDL, oxidized low-density lipoprotein antibodies; RHI, reactive hyperemia index; CCA, carotid common artery; IMT, intima-media thickness; ABI, ankle brachial index.

## 2. Subjects and methods

### 2.1. Subjects

Two hundred and fifty-seven men and women, aged 22–80 years, with no evidence of cardiovascular disease but with T2D or intermediate global cardiovascular risk (CVR) were included in the study. Complete physical examination, anthropometry, CVR assessment, vascular function and imaging studies were performed. The study was approved by the Ethical and Clinical Investigation Committee of the hospital, and all participants signed the written consent form.

### 2.2. Biochemical and biomarker determinations

Plasma levels of FABP4 were assessed using commercial kits (Bio Vendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic). Results were expressed as ng/ml. The performance characteristics of this assay were <5% CV intra-assay and <8% inter-assay.

Differential expression of inflammatory cytokines (sVCAM-1, sICAM-1, sE-Selectin, TNFα and IL-6) was determined using the Human Cytokine Antibody Array (RayBiotech, Norcross, GA, USA).

Oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL) in plasma were measured by the Mercodia Oxidized LDL ELISA, a solid-phase two-site enzyme immunoassay (Mercodia AB, Uppsala, Sweden). The ox-LDL-antibodies (Ab ox-LDL) were determined using the enzyme immunoassay (IMTEC Immunodiagnostika GmbH, Berlin, Germany).

### 2.3. Vascular function and imaging studies

The endothelial function was assessed using the EndoPAT-2000 (Itamar Medical Ltd., Israel). This method compares the pulse wave amplitude in two fingertips, one on each hand, before and after

five minutes of brachial ischemia in one of the arms (test arm). The obtained value is referred to RHI.

The carotid intima-media thickness (IMT) was evaluated by B-mode ultrasonography using an Acuson Sequoia 512 sonograph (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany).

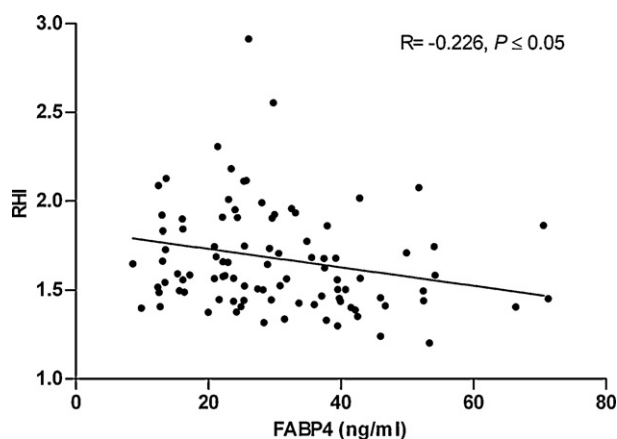
The lowest value of the ankle/arm SBP ratio measured with an 8 MHz continuous wave Doppler probe (Hadeco Mini Doppler Es 100X) was recorded as the ABI index.

### 2.4. Statistical analysis

All data were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test. Continuous variables are presented as the mean ± SD for normally distributed data, as the median (25th percentile–75th percentile) for non-normally distributed data and as frequencies (n) or percentages (%) for categorical variables. Comparisons between groups were analyzed by one-way ANOVA or the Mann–Whitney U-test. Differences in FABP4 tertile groups according to diabetes status were tested using the chi-square test. Univariate association of FABP4 with anthropometric, biochemical and vascular variables was tested by Spearman or Pearson correlation analysis. To account for inflation of the experiment-wise type 1 error resulting from multiple testing, we implemented the Bonferroni test. After this adjustment, a P ≤ 0.05 was considered statistically significant. The predictors for stepwise regression analysis were based on correlation analysis and selected from the variables known to be associated with the dependent variable. Analyses were performed using SPSS (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL). A P ≤ 0.05 was considered as statistically significant.

## 3. Results

The clinical and biochemical characteristics of the 257 patients distributed according to T2D status is summarised in Table 1.



**Fig. 1.** Relationship between fatty acid-binding protein 4 (FABP4) and RHI in subjects with T2D. Univariate association was tested by Pearson correlation analysis. Results remained statistically significant at  $P \leq 0.05$  after we adjusted for  $\alpha$  inflation caused by multiple testing.

FABP4 plasma concentrations tended to be higher in T2D patients ( $P = 0.069$ ). When the study population was divided into tertiles by FABP4 levels, the upper tertiles contained a significantly higher percentage of subjects with T2D than without it (24.8%, 36.2%, 39.0% vs. 38.8%, 31.6%, 29.6% respectively;  $P = 0.05$ ).

FABP4 correlations with age, body mass index (BMI), waist circumference, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, IL-6, TNF $\alpha$ , HsCRP, Ab ox-LDL, ox-LDL/LDL, RHI, CCA mean, IMT mean, IMT max and ABI were assessed in patients with and without T2D. In T2D patients, we observed a significant positive association with Ab ox-LDL ( $r = 0.251$ ,  $P = 0.02$ ) and a significant negative association with RHI ( $r = -0.226$ ,  $P = 0.05$ ) (Fig. 1). This correlation remained significant after adjusting for age, gender and BMI ( $P = 0.05$ ).

A linear regression model, which included age, gender, BMI, total cholesterol, triglycerides, glucose, sE-selectin, Ab ox-LDL and Hs C-reactive protein as independent variables, revealed that FABP4 was the only variable associated with RHI levels (inverse) in T2D patients ( $R^2 = 0.034$ ,  $P = 0.04$ ).

#### 4. Discussion

The main finding of our study was that circulating FABP4 levels are inversely associated with peripheral reactive hyperemia, a subrogated marker of endothelial dysfunction, in T2D patients. Multivariate analysis revealed that plasma FABP4 was the only determinant of endothelial dysfunction in T2D. This finding could reflect a direct impact of FABP4 on vascular function in this group of patients.

We also observed a significant correlation between FABP4 and Ab ox-LDL in T2D patients. These results suggest that FABP4 may be related to lipid oxidation, which is one of the main pathophysiological mechanisms leading to endothelial dysfunction.

The role of circulating FABP4 remains unknown. Because some metabolic alterations can be associated with an increase in the plasma concentration of FABP4, it could be considered as a hazard to peripheral tissues. It has recently been shown that FABP4 levels cause direct harm to myocardiocytes, which could contribute to myocardial dysfunction in situations where FABP4 is increased [11]. Our results support the hypothesis that circulating FABP4 is not only a biochemical marker but also an effector of vascular damage in T2D. Other groups have shown that FABP4 is associated with the presence of clinical and subclinical arteriosclerosis [10,14,15]. By connecting FABP4 with endothelial dysfunction, our results provide more information about the relationship between FABP4 and

arterial lesions. Although our data cannot establish a causal effect, we speculate that FABP4 may injure the endothelium.

FABP4 was associated with Ab ox-LDL in diabetic patients. Lipid oxidation appears to promote endothelial dysfunction; thus, we cannot exclude an interaction FABP4, oxidation and RHI alteration. On the other hand, it has been argued that FABP4 has a possible antioxidant effect at cellular level. However, Ab ox-LDL was not correlated to RHI in either binary or logistic correlation studies, and the association between FABP4 and RHI remained after adjusting for Ab ox-LDL.

This study has several limitations. Because it was cross-sectional, it allowed us to detect correlations but not to formulate predictions. To assess the clinical relevance of plasma FABP4 levels, prospective studies are needed.

In summary, we have demonstrated for the first time that circulating FABP4 levels are associated with endothelial dysfunction, as assessed by RHI, in T2D. If a causal relationship can be established, FABP4 plasma concentrations could be a therapeutic target for the prevention of vascular damage in T2D patients.

#### Conflict of interest

None.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from ISCIII, Madrid, Spain (PI 051954, PI 081409, FEDER). CIBERDEM are initiatives of ISCIII, Spain.

#### References

- [1] Makowski L, Boord JB, Maeda K, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:699–705.
- [2] Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB J* 2009;23:3865–73.
- [3] Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2006;188:102–11.
- [4] Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. *J Biol Chem* 2005;280:12888–95.
- [5] Cabre A, Lazaro I, Cofan M, et al. FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2009.
- [6] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007;195:e150–8.
- [7] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria. *Clin Chem* 2008;54:181–7.
- [8] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 2008;49:1746–51.
- [9] Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C, et al. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 2008;199:147–53.
- [10] Yeung DC, Xu A, Cheung CW, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1796–802.
- [11] Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res* 2009;105:326–34.
- [12] Jansson PA. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Intern Med* 2007;262:173–83.
- [13] Ter Avest E, Stalenhoef AF, de Graaf J. What is the role of non-invasive measurements of atherosclerosis in individual cardiovascular risk prediction? *Clin Sci (Lond)* 2007;112:507–16.
- [14] Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis* 2010;211:164–9.
- [15] Rhee EJ, Lee WY, Park CY, et al. The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *Eur J Endocrinol* 2009;160:165–72.





## 8. Discussió general



La discussió concreta de cada estudi està descrita específicament en cada treball, tot seguit es comenta una discussió general. Aquesta tesi pretén demostrar la utilitat de la tonometria arterial perifèrica realitzada per l'aparell EndoPAT-2000 com a eina útil en l'avaluació del risc CV.

Per assolir aquest propòsit s'han dissenyat i realitzat diversos estudis en una població d'individus de l'àrea d'influència de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus atesos a la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme. Els pacients inclosos tenen, en global, un risc CV de grau moderat, i en un estudi s'han comparat amb individus sans. Tots els estudis, menys un de prospectiu, són estudis d'associació estadística, ja sigui amb variables clíniques i proves d'arteriosclerosi subclínica d'imatge i funcionals o bé amb estudis bioquímics específics. Això pot suposar una limitació en l'interpretació dels resultats. No obstant, l'estudi prospectiu d'intervenció en canvis d'estil de vida i reactivitat hiperèmica dóna força a les altres associacions, així com també el nombre de participants en alguns dels estudis que és de 816 individus.

La tonometria arterial perifèrica amb EndoPAT-2000 ha estat estudiada en diferents poblacions, validada amb tècniques que també mesuren la reactivitat hiperèmica, com la FMD, associada a cardiopatia isquèmica, factors de risc CV i a tests invasors de funció endotelial, fins i tot amb el risc d'hospitalització per malaltia cardíaca. A diferència de la FMD, l'EndoPAT 2000 estudia la reactivitat de les petites artèries. En un estudi recent, la elasticitat de les petites artèries es relaciona amb la incidència d'esdeveniments cardiovasculars en la població adulta d'edat avançada [165] i en l'estudi FATE (*Firefighters and Their Endothelium*) la funció de la microcirculació mesurada per un nou càlcul dels resultats de la FMD, és predictora de la incidència d'esdeveniments cardiovasculars en prevenció primària [166]. No obstant, la seva utilitat en pacients amb risc CV elevat i prevenció primària no s'havia observat prèviament.

El primer estudi vincula la reactivitat hiperèmica amb els nivells de colesterol HDL, aquesta associació és la primera vegada que es descriu. La lipoproteïna HDL, com ja s'ha descrit en estudis previs, pot tenir un efecte protector de l'endoteli vascular, per les seves múltiples accions antiinflamatòries, antioxidants i pel seu paper vasodilatador a expenses d'afavorir l'activitat i síntesi de la sintasa d'ON. Aquest estudi té una especial rellevància, ja que associa el paper positiu de la lipoproteïna HDL en la vasodilatació d'artèries de mida petita i l'associa a l'acció de l'òxid nítric. El colesterol HDL és un factor de risc CV quan es troba disminuït, i de fet, en la darrera actualització del maneig de la dislipèmia de la *European Atherosclerosis Society* es defineixen unes noves taules basades en el càlcul de risc CV global segons SCORE on s'introdueixen els nivells plasmàtics de colesterol HDL.

Aquestes petites artèries són les responsables de la resistència perifèrica i de la perfusió d'òrgans diana pels factors de risc CV com la vascularització renal, cerebral o de la retina. Per altra banda, en aquest estudi, la reactivitat hiperèmica es troba relacionada de forma inversa amb altres factors de risc CV com la obesitat abdominal, la trigliceridèmia i el tabaquisme, essent aquest últim factor força influent en la capacitat vasodilatadora de l'endoteli en aquestes petites artèries. El tabac ja ha estat involucrat en la producció d'ON, mitjançant la inhibició d'alteracions en l'expressió de la sintasa d'ON, menor concentració de colesterol HDL i major inflamació. Totes aquestes troballes afavoreixen l'ús d'aquesta tècnica en l'estratificació del risc de pacients amb múltiples factors de risc CV, de fet, a l'explorar aquells individus amb síndrome metabòlica, s'observa que amb només un dels criteris present, la reactivitat hiperèmica ja és inferior.

El segon estudi demostra l'efectivitat de la determinació de la rigidesa arterial central mitjançant l'índex d'augment i la seva relació amb el GIMc. La rigidesa arterial és un fenomen patogènic implicat en l'arteriosclerosi degut a una menor viscoelasticitat de la paret arterial.

Aquest estudi demostra que en la població estudiada, l'Alx@75 és un determinant del GIMc i que es relaciona amb els factors de risc CV clàssics. Com ja s'ha descrit en d'altres treballs, l'Alx@75 és major en individus diabètics i hipertensos que en la resta, pel que la tècnica EndoPAT-2000 és comprable a les altres. A més, l'Alx@75 és un dels determinants del GIMc. Aquesta troballa dóna a entendre, que si més no, les alteracions morfològiques arterials i les funcionals conviuen en el mateix procés arterioscleròtic i que és possible que l'alteració funcional precedeixi la estructural, tal i com es va descriure a l'estudi MESA (*The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*) en pacients amb pressió arterial normal a l'inici del seguiment [167].

Cal tenir present que en ambdós estudis els pacients duïen tractament pels seus factors de risc CV que per qüestions ètiques no es pot retirar i que, per tan, aquesta teràpia pot haver influït en els resultats. No obstant, les associacions univariants han estat confirmades en l'anàlisi multivariant posterior, per evitar el biaix de variables de confusió, i entre elles els tractaments concomitants.

El tercer estudi observa la relació entre l'Alx@75 i la hipercolesterolèmia familiar. Aquesta malaltia es deu a una alteració genètica en el receptor de les lipoproteïnes LDL que confereix un hipercolesterolèmia severa. Tal i com es descriu en l'estudi, aquests pacients presenten una baixa freqüència d'altres factors de risc CV. Tot i aquesta circumstància mostren una rigidesa arterial central superior que els individus sans, i això s'associa a un GIMc incrementat. S'estableix, en aquesta població, una relació positiva entre la concentració d'apolipoproteïna B100 i la rigidesa arterial. Altre cop, aquesta troballa manifesta que en presència d'hipercolesterolèmia severa no tan sols és evident l'alteració estructural de les artèries per dipòsit de colesterol, sinó també una menor distensibilitat arterial, en aquest cas de grans artèries, ja que l'índex d'augment fa referència a sobretot artèries viscoelàstiques.

L'excés de lipoproteïnes LDL pot augmentar la rigidesa arterial afavorint la proliferació de cèl·lules musculars llises i l'augment del calci intracel·lular [168].

Aquestes dades, juntament amb el fet de que els pacients es trobaven en un control òptim del seu perfil lipídic, porta a replantejar la necessitat de teràpies suplementàries per a poder incidir sobre la rigidesa arterial central en aquesta població. El GIMc dels participants amb hipercolesterolèmia familiar, tot i ser superior a la població sana, no superen el percentil 75 segons edat i sexe, això es pot deure a que els individus inclosos porten una important càrrega de tractament hipolipemiant.

El quart treball avalua la capacitat dels canvis terapèutics d'estil de vida sobre la reactivitat hiperèmica per tonometria arterial. Els participants foren individus amb obesitat abdominal i factors de risc CV associats. La adherència a dos o més dels canvis d'estil de vida implementats es varen associar a una millora significativa de la reactivitat hiperèmica i a menor progressió del GIMc en el grup amb canvis d'estil de vida sota un règim intensiu contra el grup de seguiment convencional. Aquestes associacions són de vital importància en el maneig del risc cardiovascular, ja que els canvis d'estil de vida són la base fonamental de l'abordatge terapèutic d'aquells pacients amb sobrepès, obesitat, manca d'exercici físic diari, alimentació proaterogènica i tabaquisme. Aquest estudi, efectuat en pacients amb tractament pels seus factors de risc i als quals se'ls va modificar ben poc, i amb una anàlisi estadística ajustada pel tractament, demostra que els canvis d'estil de vida poden tenir un efecte protector en l'arteriosclerosi en fases inicials i que són capaços de desaccelerar aquest procés. El fet de deixar de fumar i d'incrementar l'exercici físic foren els canvis amb més incidència en la reactivitat hiperèmica, no en canvi la pèrdua de pes, tal i com també es descriu en un estudi recent amb pacients amb síndrome metabòlica no diabètics [169].

Pel que fa referència al seguiment i compliment, cal remarcar que és difícil que persones en edat adulta i amb activitat laboral puguin seguir de forma correcta els canvis d'estil de vida, només el 70% dels participants van atendre a la meitat de les sessions i només el 30% van acudir a més del 75% de les sessions, dades que són comprables a d'altres estudis similars, pel que sens dubte l'educació infantil i dels pares i mares constitueix el principal objectiu a nivell social. Finalment, aquest estudi mostra que aquells pacients que milloren més el RHI són també els que tenen una menor progressió en el GIMc, aquesta troballa, ja descrita amb FMD [170], és la primera vegada que es descriu amb la tonometria arterial perifèrica.

Els treballs 5 i 6 mostren la associació de la tècnica de tonometria arterial perifèrica EndoPAT-2000 amb marcadors biològics d'inflamació i funció endotelial. El RHI té una correlació directa amb un marcador molt específic de l'endoteli com és la selectina-E que participa en el primer contacte del monòcit amb la cèl·lula endotel·lial pel seu pas a la paret vascular. Aquest fenomen característic de la disfunció de l'endoteli és clau en el procés ateroscleròtic, pel que reforça la hipòtesi de que la hiperèmia reactiva mesurada per tonometria arterial perifèrica representa el que succeeix en presència de factors de risc CV. En un pas més enllà de l'integració a l'espai subendotelial del leucòcit hi participa la VCAM-1, una integrina que facilita la translocació monocitària al subendoteli amb una unió més estable de la que proporcionen les selectines, els nivells més alts de VCAM-1 s'associen a menor reactivitat hiperèmica, així com també la reactivitat hiperèmica és menor quan l'estat oxidatiu és major, tal i com es demostra amb la relació a major lipoproteïna LDL oxidada/LDL menor RHI. L'associació de disfunció endotelial amb aquests marcadors biològics ja s'havia descrit amb anterioritat amb FMD [171, 172, 173], però el nostre estudi ho vincula amb la reactivitat de les petites artèries. La proteïna FABP4 està inversament associada al RHI en individus diabètics tipus 2.

La FABP4 ha resultat ser l'únic determinant del RHI en l'anàlisi multivariant en la població amb DM2 i es correlaciona de forma significativa amb els nivells d'anticossos anti-LDLox, pel que suggereix pugui tenir un paper en l'oxidació lipídica i la disfunció endotelial en aquests pacients. Aquestes observacions recolzen la teoria de que FABP4 pot tenir efectes a òrgans i teixits perifèrics. A més, en un estudi publicat recentment es troba relació entre la FABP plasmàtica i la inflamació vascular a la paret carotídia detectada per tomografia per emissió de positrons [174].

En resum, la tonometria arterial perifèrica per endoPAT-2000 és capaç de detectar associacions de la reactivitat hiperèmica de petites artèries amb els factors de risc CV, i amb especial rellevància dels nivells de colesterol HDL, mostrant l'interès que té aquesta lipoproteïna en la vasodilatació arterial d'artèries resistents. La rigidesa arterial per Alx segons aquesta tècnica s'associa també als factors de risc CV i és un determinant del GIMc, a més en la hipercolesterolèmia familiar es demostra major rigidesa arterial central tot i que els participants presentaven un control òptim de colesterol LDL, la qual cosa suggereix que el risc CV d'aquesta malaltia hi és present més enllà del bon control de la seva principal manifestació que és la hipercolesterolèmia. Els canvis d'estil de vida implantats de forma intensa són capaços de millorar la vasodilatació d'artèries de mida petita, reforçant així el seu paper protector en el risc CV. El RHI, com a marcador indirecte de la funció de l'endoteli vascular es correlaciona amb altres marcadors bioquímics dependents de la cèl·lula endotel·lial com les molècules d'adhesió, inflamació i de risc metabòlic.







## 8. Conclusions



- La tonometria arterial perifèrica realitzada mitjançant l'aparell EndoPAT-2000 ens aporta la mesura de la reactivitat hiperèmica d'artèries de mida petita i la rigidesa arterial central.
- Els resultats d'aquesta tècnica en una població de pacients amb risc cardiovascular elevat i prevenció primària aporta nous coneixements sobre la reactivitat hiperèmica d'artèries perifèriques de mida petita, les causant de la resistència arterial, on la lipoproteïna HDL juga un paper protector i alguns factors de risc CV clàssics, com el tabaquisme, la trigliceridèmia i el perímetre abdominal augmentat, empitjoren la vasodilatació posterior a una isquèmia.
- Els canvis terapèutics de l'estil de vida milloren la capacitat vasodilatadora arterial perifèrica, especialment el fet de deixar de fumar i l'increment d'exercici físic .
- La rigidesa arterial mesurada per l'índex d'augment és un determinant del GIMc i els pacients amb hipercolesterolèmia familiar presenten major rigidesa arterial que els controls sans.
- El RHI, marcador indirecte de funció endotel·lial, s'associa a paràmetres bioquímics de disfunció de l'endoteli com la selectina-E, la VCAM-1 i la oxidació lipídica.

- La FABP4 s'associa a la disfunció endotel·lial dels pacients amb DM2 i pot tenir un paper patogènic en aquest procés.
- El coneixement dels condicionants de la reactivitat de petites artèries pot ajudar a entendre lesions d'òrgans diana dels factors de risc CV com són els ronyons, el cervell o la retina.
- Els estudis presentats aporten aquests resultats en pacients que estaven en tractament pels factors de risc CV, això és important donat que aquesta és la situació clínica habitual.
- Tots aquests treballs defineixen les bases per proposar estudis prospectius amb l' intenció de valorar la utilitat pronòstica de la tonometria arterial perifèrica mitjançant EndoPAT-2000 en la detecció de la supervivència dels pacients amb risc CV elevat.

## 10. Referències bibliogràfiques





- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.
- [2] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- [3] Nabel EG. Cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2003;349:60-72.
- [4] Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C7-1.
- [5] World Health Organization Fact Sheet N° 310. May 2011
- [6] Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Graciani A, Villar F, Herruzo R. Mortality attributable to cardiovascular risk factors in Spain. *Eur J Clin Nutr* 2003;57 Suppl 1:S18-21
- [7] . Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A; 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension Hypertension 2007, 25:1105–1187.
- [8] Márquez-Contreras, Emilio; Coca, Antonio; de la Figuera von Wichmann, Mariano; Antonio Divisón, Juan; Llisterri, José Luis; Sobrino, Javier; Filozof, Claudia; Sánchez-Zamorano, Miguel Ángel; Grigorian Shamagian, Lilian. Perfil de riesgo cardiovascular de los pacientes con hipertensión arterial no controlada. Estudio Control-Project. *Med Clin (Barc).* 2007;128:86-91
- [9] Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004 Sep 11-17;364(9438):937-52.

[10] Anderson KM, Wilson PW, Odell PM, Kannel WB. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation*. 1991 Jan;83(1):356-62

[11] Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003 Jun;24(11):987-1003

[12] Marrugat J, Solanas P, D'Agostino R, Sullivan L, Ordovas J, Cordón F, Ramos R, Sala J, Masià R, Rohlf s I, Elosua R, Kannel WB. Coronary risk estimation in Spain using a calibrated Framingham function. *Rev Esp Cardiol*. 2003 Mar;56(3):253-6

[13] Cooney MT, Dudina AL, Graham IM. Value and limitations of existing scores for the assessment of cardiovascular risk. A review for clinicians. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:1209–1227.

[14] Cooney MT, Dudina A, d'Agostino R, Graham IM. Cardiovascular risk estimation systems in primary prevention. Do they differ? Do they make a difference? Can we see the future? *Circulation* 2010;122:300–310.

[15] Melander O, Newton-Cheh C, Almgren P, Hedblad B, Berglund G, Engström G, Persson M, Smith JG, Magnusson M, Christensson A, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Pencina MJ, Wang TJ. Novel and conventional biomarkers for prediction of incident cardiovascular events in the community. *JAMA*. 2009 Jul 1;302(1):49-57.

- [16] Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, Anderson JL, Gorelick PB, Jones PH, Lerman A, McConnell JP, Weintraub HS. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Lancet*. 2008 Mar 15;371(9616):923-31.
- [17] Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ. Laboratory-based versus non-laboratory-based method for assessment of cardiovascular disease risk: the NHANES I Follow-up Study cohort. Gaziano TA, Young CR, Fitzmaurice G, Atwood S, Gaziano JM., Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2010 Feb 2;121(4):505-11.
- [18] Zethelius B, Berglund L, Sundström J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A, Venge P, Arnlöv J. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2008 May 15;358(20):2107-16.
- [19] van Trijp MJ, Bos WJ, van der Schouw YT, Muller M, Grobbee DE, Bots ML. Non-invasively measured structural and functional arterial characteristics and coronary heart disease risk in middle aged and elderly men. *Atherosclerosis*. 2006 Jul;187(1):110-5.

[20] Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008–2010 and 2010–2012 Committees, Bax J, Vahanian A, Auricchio A, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hobbs R, Hoes A, Kearney P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Poldermans D, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vardas P, Widimsky P, Windecker S; Document Reviewers: Funck-Brentano C, Poldermans D, Berkenboom G, De Graaf J, Descamps O, Gotcheva N, Griffith K, Guida GF, Gulec S, Henkin Y, Huber K, Kesaniemi YA, Lekakis J, Manolis AJ, Marques-Vidal P, Masana L, McMurray J, Mendes M, Pagava Z, Pedersen T, Prescott E, Rato Q, Rosano G, Sans S, Stalenhoef A, Tokgozoglul L, Viigimaa M, Wittekoek ME, Zamorano JL. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). Developed with the special contribution of: European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation; Authors/Task Force Members, Eur Heart J. 2011 Jun 28.

[21] Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaut E, Woo KS, Zannad F, Zureik M. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. Cerebrovasc Dis. 2007;23(1):75-80.

- [22] Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, Najjar SS, Rembold CM, Post WS; American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008
- [23] Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, Foster E, Hlatky MA, Hodgson JM, Kushner FG, Lauer MS, Shaw LJ, Smith SC Jr, Taylor AJ, Weintraub WS, Wenger NK, Jacobs AK, Smith SC Jr, Anderson JL, Albert N, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Guyton RA, Halperin JL, Hochman JS, Kushner FG, Nishimura R, Ohman EM, Page RL, Stevenson WG, Tarkington LG, Yancy CW; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. 2010 ACCF/AHA Guideline for Assessment of Cardiovascular Risk in Asymptomatic Adults: Executive Summary. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(25):e50-103
- [24] O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999;340:14-22.
- [25] Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2007 Jan 30;115(4):459-67.
- [26] Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, Azen SP. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med.* 1998 Feb 15;128(4):262-9.

- [27] Balk EM, Karas RH, Jordan HS, Kupelnick B, Chew P, Lau J. Effects of statins on vascular structure and function: a systematic review. *Am J Med* 2004;117:775-90.
- [28] Riccioni G. The effect of antihypertensive drugs on carotid intima media thickness: an up-to-date review. *Curr Med Chem*. 2009;16(8):988-96.
- [29] Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN; REVERSAL Investigators. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004 Mar 3;291(9):1071-80.
- [30] Kastelein JJ, Akdim F, Stroes ES, Zwinderman AH, Bots ML, Stalenhoef AF, Visseren FL, Sijbrands EJ, Trip MD, Stein EA, Gaudet D, Duivenvoorden R, Veltri EP, Marais AD, de Groot E; ENHANCE Investigators. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 2008 Apr 3;358(14):1431-43.
- [31] Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004 Apr 8;350(15):1495-504.
- [32] Naghavi M, Falk E, Hecht HS, Shah PK. The first SHAPE (Screening for Heart Attack Prevention and Education) guideline. *Crit Pathw Cardiol* 2006;5:187-90.
- [33] Goldberger ZD, Valle JA, Dandekar VK, Chan PS, Ko DT, Nallamothu BK. Are changes in carotid intima-media thickness related to risk of nonfatal myocardial infarction? A critical review and meta-regression analysis. *Am Heart J*. 2010 Oct;160(4):701-14.

- [34] Vijay Nambi, Lloyd Chambless, Aaron R. Folsom, Max He, MS, Yijuan Hu, Tom Mosley, Kelly Volcik, Eric Boerwinkle, Christie M. Ballantyne. Carotid Intima-Media Thickness and Presence or Absence of Plaque Improves Prediction of Coronary Heart Disease Risk. The ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) Study. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1600–7.
- [35] Sharma RK, Sharma RK, Voelker DJ, Singh VN, Pahuja D, Nash T, Reddy HK. Cardiac risk stratification: role of the coronary calcium score. *Vasc Health Risk Manag.* 2010 Aug 9;6:603-11.
- [36] Arad Y, Spadaro LA, Goodman K, Newstein D, Guerci AD. Prediction of coronary events with electron beam computed tomography. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(4):1253–1260.
- [37] Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA.* 2004;291(2):210–215.
- [38] LaMonte MJ, FitzGerald SJ, Church TS, et al. Coronary artery calcium score and coronary heart disease events in a large cohort of asymptomatic men and women. *Am J Epidemiol.* 2005;162(5):421–429.
- [39] Taylor AJ, Bindeman J, Feuerstein I, Cao F, Brazaitis M, O'Malley PG. Coronary calcium independently predicts incident premature coronary heart disease over measured cardiovascular risk factors: Mean three-year outcomes in the Prospective Army Coronary Calcium (PACC) project. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(5):807–814.
- [40] Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, et al. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med.* 2008; 358(13):1336–1345.

- [41] Bruce A. Wasserman, A. Richey Sharrett, Shenghan Lai, Antoinette S. Gomes, Mary Cushman, Aaron R. Folsom, Diane E. Bild, Richard A. Kronmal. Risk Factor Associations With the Presence of a Lipid Core in Carotid Plaque of Asymptomatic Individuals Using High-Resolution MRI The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Stroke*. 2008;39:329-335.
- [42] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III27-32.
- [43] Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool?. *Chest* 2005;127:2254-63.
- [44] Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285-95.
- [45] Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flowmediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007;115:2390-7.
- [46] Yeboah J, Sutton-Tyrrell K, McBurnie MA, Burke GL, Herrington DM, Crouse JR. Association between brachial artery reactivity and cardiovascular disease status in an elderly cohort: the cardiovascular health study. *Atherosclerosis* 2008;197:768-76.
- [47] O'Rourke MF, Seward JB. Central arterial pressure and arterial pressure pulse: new views entering the second century after Korotkov. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(8):1057-106.
- [48] Breasted JH. *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. Vol 1. Chicago, IL: University of Chicago Press; 1930:105.



- [49] Acierno L. The History of Cardiology. 1 ed. Taylor and Francis; 1994:75.
- [50] Snellen HA. E.J. Marey and Cardiology: Physiologist and Pioneer of Technology (1830-1904). Rotterdam, The Netherlands: Kooyker Scientific Publications; 1980.
- [51] Kroeker EJ, Wood EH. Comparison of simultaneously recorded central and peripheral arterial pressure pulses during rest, exercise and tilted position in man. *Circ Res.* 1955;3(6):623-632.
- [52] Matthew R. Nelson, Jan Stepanek, Michael Cevette, Michael Covalciuc, R. Todd Hurst, and A. Jamil Tajik. Noninvasive Measurement of Central Vascular Pressures With Arterial Tonometry: Clinical Revival of the Pulse Pressure Waveform?. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(5):460-472.
- [53] Karamanoglu M, O'Rourke MF, Avolio AP, Kelly RP. An analysis of the relationship between central aortic and peripheral upper limb pressure waves in man. *Eur Heart J.* 1993;14(2):160-167, Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND. Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. *Hypertension.* 2001;38(4):932-937.
- [54] Crilly M, Coch C, Bruce M, Clark H, Williams D. Repeatability of central aortic blood pressures measured non-invasively using radial artery applanation tonometry and peripheral pulse wave analysis. *Blood Press.* 2007;16(4):262-269.
- [55] Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137-41.

[56] Kuvin JT, Mammen A, Mooney P, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Assessment of peripheral vascular endothelial function in the ambulatory setting. *Vasc Med* 2007;12:13-6.

[57] Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146:168-74.

[58] Haller MJ, Stein J, Shuster J, et al. Peripheral artery tonometry demonstrates altered endothelial function in children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2007;8:193-8.

[59] Naomi M. Hamburg, Joseph Palmisano, Martin G. Larson, Lisa M. Sullivan, Birgitta T. Lehman, Ramachandran S. Vasan, Daniel Levy, Gary F. Mitchell, Joseph A. Vita, Emelia J. Benjamin. Relation of Brachial and Digital Measures of Vascular Function in the Community: The Framingham Heart Study. *Hypertension* 2011;57:390-396.

[60] Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* 2006;101:545-8.

[61] Hamburg NM, Benjamin EJ. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19:6-11.

[62] Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:2467-74.

[63] Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010;31:1142-8.

- [64] Bonetti PO, Barsness GW, Keelan PC, et al. Enhanced external counterpulsation improves endothelial function in patients with symptomatic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1761-8.
- [65] Aversa A, Vitale C, Volterrani M, et al. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2008;25:37-44.
- [66] Dhindsa M, Sommerlad SM, DeVan AE, et al. Interrelationships among noninvasive measures of postischemic macro- and microvascular reactivity. *J Appl Physiol* 2008;105:427-32.
- [67] Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, et al. Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1688-96.
- [68] Heffernan KS, Patvardhan EA, Hession M, Ruan J, Karas RH, Kuvin JT. Elevated augmentation index derived from peripheral arterial tonometry is associated with abnormal ventricular-vascular coupling. *Clin Physiol Funct Imaging* 2010;30(5):313-7.
- [69] Heffernan KS, Suryadevara R, Patvardhan EA, Mooney P, Karas RH, Kuvin JT. Effect of atenolol vs metoprolol succinate on vascular function in patients with hypertension. *Clin Cardiol*. 2011; 34(1):39-44.
- [70] Yiu KH, Yeung CK, Chan HT, Wong RM, Tam S, Lam KF, Yan GH, Yue WS, Chan HH, Tse HF. Increased arterial stiffness in patients with psoriasis is associated with active systemic inflammation. *Br J Dermatol*. 2011;164(3):514-20.

- [71] Aversa A, Letizia C, Francomano D, Bruzziches R, Natali M, Lenzi A. A spontaneous, double-blind, double-dummy cross-over study on the effects of daily vardenafil on arterial stiffness in patients with vasculogenic erectile dysfunction. *Int J Cardiol*. 2011. Epub.
- [72] Drexler H, Kastner S, Strobel A, Studer R, Brodde OE, Hasenfuss G. Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:955-63.
- [73] Luscher TF, Tschudi MR, Wenzel RR, Noll G. [Endothelial dysfunction and nitrogen monoxide (NO; nitric oxide)]. *Internist (Berl)* 1997;38:411-9.
- [74] Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-5.
- [75] Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* 2001;276:30392-8.
- [76] Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord* 2010;11:61-74.
- [77] Natarajan P, Ray KK, Cannon CP. High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1283–99.
- [78] Kuvin JT, Patel AR, Sidhu M, et al. Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function. *Am J Cardiol* 2003;92:275–9.

- [79] Lupattelli G, Marchesi S, Roscini AR, et al. Direct association between high-density lipoprotein cholesterol and endothelial function in hyperlipemia. *Am J Cardiol* 2002;90:648–50.
- [80] O'Brien SF, Watts GF, Playford DA, Burke V, O'Neal DN, Best JD. Low-density lipoprotein size, high-density lipoprotein concentration, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med* 1997;14:974–8.
- [81] Zhang X, Zhao SP, Li XP, Gao M, Zhou QC. Endothelium-dependent and -independent functions are impaired in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000;149:19–24.
- [82] Rämetsä ME, Rämetsä M, Lu Q, et al. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2288–97.
- [83] Nofer JR, van der Giet M, Tölle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 2004;113:569–81.
- [84] Jansson PA. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Intern Med* 2007;262:173–83.
- [85] Mather KJ, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes. *Diabetes* 2004;53:2060–6.
- [86] Izzo JL Jr. Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome. *Curr Opin Cardiol* 2004;19:341–52.

- [87] Lee RT, Kamm RD. Vascular mechanics for the cardiologist. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1289–95.
- [88] O'Rourke MF, Staessen JA, Vlachopoulos C, Duprez D, Plante GE. Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values. *Am J Hypertens* 2002;15:426–44.
- [89] Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27:2588–605.
- [90] Sharman JE, Davies JE, Jenkins C, Marwick TH. Augmentation index, left ventricular contractility, and wave reflection. *Hypertension* 2009;54:1099–105.
- [91] McEniery CM, Spratt M, Munnery M, et al. An analysis of prospective risk factors for aortic stiffness in men: 20-year follow-up from the Caerphilly prospective study. *Hypertension* 2010;56:36–43.
- [92] Khoshdel AR, Thakkestian A, Carney SL, Attia J. Estimation of an age-specific reference interval for pulse wave velocity: a meta-analysis. *J Hypertens* 2006;24:1231–7.
- [93] Yasmin, McEniery CM, O'Shaughnessy KM, et al. Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1799–805.
- [94] Nichols WW, O'Rourke MF. Vascular impedance. *McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles*. 5th edn. London: Hodder Arnold, 2005; 216–231.

- [95] Pannier B, Guérin AP, Marchais SJ et al. Stiffness of capacitive and conduit arteries: prognostic significance for end-stage renal disease patients. *Hypertension* 2005; 45: 592–596.
- [96] Holewijn S, den Heijer M, Stalenhoef AF, de Graaf J. Non-invasive measurements of atherosclerosis (NIMA): current evidence and future perspectives. *Neth J Med.* 2010 Dec;68(12):388-99.
- [97] Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, Jeppesen J: Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation*, 2006; 113: 664-670.
- [99] Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, Vita JA, Lewy D, Benjamin EJ: Arterial stiffness and cardiovascular events: The Framingham Heart Study. *Circulation*, 2010; 121: 505-511.
- [100] Ong KT, Delorme S, Pannier B, Safar ME, Benetos A, Laurent S, Boutouyrie P; investigators. Aortic stiffness is reduced beyond blood pressure lowering by short-term and long-term antihypertensive treatment: a meta-analysis of individual data in 294 patients. *J Hypertens.* 2011 Jun;29(6):1034-42.
- [101] Lane HA, Smith JC, Davies JS: Noninvasive assessment of preclinical atherosclerosis. *Vasc Health Risk Man*, 2006; 2: 19-30.
- [102] Glasser SP, Arnett DK, McVeigh GE, Finkelstein SM, Bank A, Morgan D, Cohn JN: Vascular compliance and cardiovascular disease: a risk factor or a marker? *Am J Hypertens*, 1997; 10: 1175–1189.
- [103] Janner JH, Godtfredsen NS, Ladelund S, Vestbo J, Prescott E. The association between aortic augmentation index and cardiovascular risk factors in a large unselected population. *J Hum Hypertens.* 2011 Jun 9. doi: 10.1038/jhh.2011.59.

- [104] Williams B, Lacy PS, Thom SM, Cruickshank K, Stanton A, Collier D, Hughes AD, Thurston H, O'Rourke M, for the CAFE and ASCOT Investigators. Differential impact of blood pressure lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation study: the CAFE Study. *Circulation*. 2006;113:1213–1225.
- [105] Topouchian J, El Feghali R, Pannier B, Wang S, Zhao F, Smetana K, Teo K, Asmar R. Arterial stiffness and pharmacological interventions--the TRanscend arterial stiffNess Substudy (TRANS study). *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(4):381-7.
- [106] Cherney DZ, Lai V, Scholey JW, Miller JA, Zinman B, Reich HN. Effect of direct renin inhibition on renal hemodynamic function, arterial stiffness, and endothelial function in humans with uncomplicated type 1 diabetes: a pilot study. *Diabetes Care*. 2010 Feb;33(2):361-5.
- [107] Safar ME. Can antihypertensive treatment reverse large-artery stiffening?. *Curr Hypertens Rep*. 2010 Feb;12(1):47-51.
- [108] Wattanakit K, Folsom AR, Duprez DA, Weatherley BD, Hirsch AT. Clinical significance of a high ankle-brachial index: insights from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis* 2007;190:459-64.
- [109] Suarez C, Manzano L, Mostaza J, et al. [Prevalence of peripheral artery disease evaluated by ankle brachial index in patients with metabolic syndrome. MERITO I study]. *Rev Clin Esp* 2007;207:228-33.
- [110] Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2006;368:33-47.



[111] Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 2003;108:1917-23.

[112] Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation* 2003;108:2041-8.

[113] Zakynthinos E, Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *J Cardiol.* 2009 Jun;53(3):317-33.

[114] Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 2005;93:228-35.

[115] De Caterina R, Libby P. Endothelial dysfunctions and vascular diseases. 2007.

[116] Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.

[117] Roldan V, Marin F, Lip GY, Blann AD. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. *Thromb Haemost* 2003;90:1007-20.

[118] Sakurai S, Kitamura A, Cui R, Yamagishi K, Tanigawa T, Iso H. Relationships of soluble E-selectin and high-sensitivity C-reactive protein with carotid atherosclerosis in Japanese men. *J Atheroscler Thromb* 2009;16:339-45.

[119] Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *Jama* 2004;291:1978-86.

[120] Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 1993;13:197-204.

[121] De Caterina R, Basta G, Lazzerini G, et al. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2646-54.

[122] Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351:88-92.

[123] Malik I, Danesh J, Whincup P, et al. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet* 2001;358:971-6.

[124] Scheffer PG, Bos G, Volwater HG, Dekker JM, Heine RJ, Teerlink T. Associations of LDL size with in vitro oxidizability and plasma levels of in vivo oxidized LDL in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2003;20:563-7.

[125] Piarulli F, Lapolla A, Sartore G, et al. Autoantibodies against oxidized LDLs and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:653-7.

[126] Ceriello A. Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:510-8.

[127] Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol* 2004;59:479-84.

[128] Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;174:343-7.

[129] Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004;145:2273-82.

[130] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005;96:939-49.

[131] Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000;148:209-14.

[132] Min JK, Kim YM, Kim SW, et al. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Immunol* 2005;175:531-40.

[133] Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92:347-55.

[134] Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:911-9; quiz 20.

[135] Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.

[136] Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002;106:913-9.

- [137] Thakore AH, Guo CY, Larson MG, et al. Association of multiple inflammatory markers with carotid intimal medial thickness and stenosis (from the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 2007;99:1598-602.
- [138] Sakurai S, Kitamura A, Cui R, Yamagishi K, Tanigawa T, Iso H. Relationships of soluble E-selectin and high-sensitivity C-reactive protein with carotid atherosclerosis in Japanese men. *J Atheroscler Thromb* 2009;16:339-45. *N Engl J Med*. 2008 Nov 20;359(21):2195-207.
- [139] Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008 Nov 20;359(21):2195-207.
- [140] Krusinova E, Pelikanova T. Fatty acid binding proteins in adipose tissue: a promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis? *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82 Suppl 2:S127-34.
- [141] Boord JB, Fazio S, Linton MF. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:141-7.
- [142] Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB J* 2009;23:3865-73.
- [143] Makowski L, Boord JB, Maeda K, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:699-705.

- [144] Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. *J Biol Chem* 2005;280:12888-95
- [145] Cabre A, Lazaro I, Cofan M, et al. FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2009.
- [146] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007;195:e150–8.
- [147] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria. *Clin Chem* 2008;54:181–7.
- [148] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 2008;49:1746–51.
- [149] Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C, et al. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 2008;199:147–53.
- [150] Yeung DC, Xu A, Cheung CW, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1796–802.
- [151] Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res* 2009;105:326–34.

- [152] Uusitupa M, Peltonen M, Lindstrom J, Aunola S, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, et al. Ten-year mortality and cardiovascular morbidity in the Finnish Diabetes Prevention Study. Secondary analysis of the randomized trial. *PLoS One* 2009;4:e5656.
- [153] van Dam RM, Li T, Spiegelman D, Franco OH, Hu FB. Combined impact of lifestyle factors on mortality: prospective cohort study in US women. *BMJ* 2008;337:1440.
- [154] Herder C, Peltonen M, Koenig W, Sutfels K, Lindstrom J, Martin S, et al. Anti-inflammatory effect of lifestyle changes in the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia* 2009. 52:433-42.
- [155] Maruthur NM, Wang NY, Appel LJ. Lifestyle interventions reduce coronary heart disease risk: results from the PREMIER Trial. *Circulation* 2009;119:2026-31.
- [156] Tonstad S, Sundfor T, Seljeflot I. Effect of lifestyle changes on atherogenic lipids and endothelial cell adhesion molecules in young adults with familial premature coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2005;95:1187-91.
- [157] Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, et al. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1760e71.
- [158] Wendel-Vos GC, Dutman AE, Verschuren WM, Ronckers ET, Ament A, van Assema P, et al. Lifestyle factors of a five-year community-intervention program: the Hartslag Limburg intervention. *Am J Prev Med* 2009;37:50-6.

- [159] Wood DA, Kotseva K, Connolly S, Jennings C, Mead A, Jones J, et al. Nurse-coordinated multidisciplinary, family-based cardiovascular disease prevention programme (EUROACTION) for patients with coronary heart disease and asymptomatic individuals at high risk of cardiovascular disease: a paired, cluster-randomised controlled trial. *Lancet* 2008;371: 1999-2012.
- [160] Campbell SC, Moffatt RJ, Stamford BA. Smoking and smoking cessation- the relationship between cardiovascular disease and lipoprotein metabolism: a review. *Atherosclerosis* 2008;201:225–35.
- [161] Yannakoulia M, Poulia KA, Mylona E, Kontogianni MD. Effectiveness of an intensive nutritional intervention in patients with type 2 diabetes mellitus: results from a pilot study. *Rev Diabet Stud* 2007;4:226-30.
- [162] Eriksson MK, Franks PW, Eliasson M. A 3-year randomized trial of lifestyle intervention for cardiovascular risk reduction in the primary care setting: the Swedish Bjorknas study. *PLoS One* 2009;4:5195.
- [163] Aadahl M, von Huth Smith L, Pisinger C, Toft UN, Glumer C, Borch-Johnsen K, et al. Five-year change in physical activity is associated with changes in cardiovascular disease risk factors. The Inter99 study. *Prev Med*; 2009: Apr;48(4):326-3.

[164] Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct 20;120(16):1640-5.

[165] Duprez DA, Jacobs DR Jr, Lutsey PL, Bluemke DA, Brumback LC, Polak JF, Peralta CA, Greenland P, Kronmal RA. Association of Small Artery Elasticity With Incident Cardiovascular Disease in Older Adults: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Epidemiol*. 2011 Jun 27.

[166] Anderson TJ, Charbonneau F, Title LM, Buithieu J, Rose MS, Conradson H, Hildebrand K, Fung M, Verma S, Lonn EM. Microvascular function predicts cardiovascular events in primary prevention: long-term results from the Firefighters and Their Endothelium (FATE) study. *Circulation*. 2011 Jan 18;123(2):163-9.

[167] Peralta CA, Adeney KL, Shlipak MG, Jacobs D Jr, Duprez D, Bluemke D, Polak J, Psaty B, Kestenbaum BR. Structural and Functional Vascular Alterations and Incident Hypertension in Normotensive Adults The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Epidemiol* 2010;171:63–71

[168] Wilkinson I, Cockcroft JR. Cholesterol, lipids and arterial stiffness. *Adv Cardiol*. 2007;44:261-77.



- [169] Seligman BG, Polanczyk CA, Santos AS, Foppa M, Junges M, Bonzanini L, Nicolaidis G, Camey S, Lopes AL, Sehl P, Duncan BB, Clausell N. Intensive practical lifestyle intervention improves endothelial function in metabolic syndrome independent of weight loss: a randomized controlled trial. *Metabolism*. 2011 Jun 21.
- [170] Masoura C, Pitsavos C, Aznaouridis K, Skoumas I, Vlachopoulos C, Stefanadis C. Arterial endothelial function and wall thickness in familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia and the effect of statins. A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2011 Jan;214(1):129-38.
- [171] Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC, Mitchell G, Oates C, Razvi S, Weaver JU, Shaw JA, Home PD. Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia*. 2009 Aug;52(8):1464-73.
- [172] Keogh JB, Brinkworth GD, Noakes M, Belobrajdic DP, Buckley JD, Clifton PM. Effects of weight loss from a very-low-carbohydrate diet on endothelial function and markers of cardiovascular disease risk in subjects with abdominal obesity. *Am J Clin Nutr*. 2008 Mar;87(3):567-76.
- [173] Eschen O, Christensen JH, Dethlefsen C, Schmidt EB. Cellular Adhesion Molecules in Healthy Subjects: Short Term Variations and Relations to Flow Mediated Dilation. *Biomark Insights*. 2008 Feb 14;3:57-62.
- [174] Yoo HJ, Kim S, Park MS, Choi HY, Yang SJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is associated independently with vascular inflammation: analysis with (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Mar;96(3):E488-92.



## 11. Annex



## METBANC

### CONSENTIMENT INFORMAT

El/La.....  
.....informa el pacient

Sr./Sra. ....  
de l'existència d'un projecte d'investigació de factors de risc cardiovascular i demana la seva participació.

#### **Estudi clínic i genètic de pacients amb factors de risc cardiovascular majors: Hipertensió arterial, diabetis mellitus tipus 2, hiperlipèmia i síndrome metabòlica**

Aquest projecte té per objectiu estudiar condicions clíniques i gens que es sospiti que poden estar relacionats amb la causa de malalties cardiovasculars o bé buscar nous gens que augmentin la susceptibilitat per presentar la malaltia. Al tractar-se d'un estudi genètic es necessiten àcids nucleics (ADN, ARN) que s'obtenen d'una mostra de sang de persones afectes de factors de risc cardiovascular majors com són la hipertensió arterial, la hiperlipèmia, la diabetis mellitus tipus 2 i la síndrome metabòlica. També és necessari treballar amb algunes dades de la història clínica, la realització d'una ecografia d'arteries caròtides i femorals i d'una prova de mesura no invasiva de la disfunció endotel·lial mitjançant capilaroscòpia digital. Després d'efectuar les anàlisis bioquímiques i genètiques pertinents es busca correlació entre aquestes variables i la malaltia.

L'estudi no suposa cap risc que no sigui el derivat de l'extracció de sang.

El benefici de l'estudi és profunditzar en el coneixement de la malaltia per millorar la detecció, el diagnòstic i el tractament. A curt termini no es preveu que els resultats obtinguts de l'estudi puguin beneficiar al participant, sinó que en tot cas aquests resultats beneficiaran a tota la població.

Els responsables de l'estudi, i per tan de les mostres i les dades, són investigadors de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus, CAP Cambrils i CAP Reus V, que poden establir col·laboracions científiques amb altres institucions acadèmiques o empreses privades. En el cas de les empreses privades, aquestes poden obtenir beneficis econòmics derivats dels descobriments que es facin amb aquestes col·leccions. La col·laboració amb altres institucions pot suposar que es cedeixi part de la mostra, procediment que es farà tenint en compte les normes de confidencialitat i seguretat que li hem explicat.

L'equip investigador garanteix la confidencialitat respecte a la identitat del participant i per altra banda garanteix que la col·lecció i els resultats derivats de la investigació seran utilitzats per la finalitat descrita i no d'altra.

He estat informat de la naturalesa de l'estudi que es resumeix en aquesta fulla i la d'informació al participant, he pogut fer preguntes que aclareixen els meus dubtes i finalment he pres la decisió de participar, sabent que la decisió no afecta la meva atenció mèdica al centre i que em puc retirar de l'estudi en qualsevol moment.

	Nom i cognoms	Data	Signatura
Pacient			
Informant			

## EXEMPLAR PEL PARTICIPANT

### METBANC

#### CONSENTIMENT INFORMAT

El/La.....  
.....informa el pacient

Sr./Sra. ....  
de l'existència d'un projecte d'investigació de factors de risc cardiovascular i demana la seva participació.

#### **Estudi clínic i genètic de pacients amb factors de risc cardiovascular majors: Hipertensió arterial, diabetis mellitus tipus 2, hiperlipèmia i síndrome metabòlica**

Aquest projecte té per objectiu estudiar condicions clíniques i gens que es sospiti que poden estar relacionats amb la causa de malalties cardiovasculars o bé buscar nous gens que augmentin la susceptibilitat per presentar la malaltia. Al tractar-se d'un estudi genètic es necessiten àcids nucleics (ADN, ARN) que s'obtenen d'una mostra de sang de persones afectes de factors de risc cardiovascular majors com són la hipertensió arterial, la hiperlipèmia, la diabetis mellitus tipus 2 i la síndrome metabòlica. També és necessari treballar amb algunes dades de la història clínica, la realització d'una ecografia d'arteries caròtides i femorals i d'una prova de mesura no invasiva de la disfunció endotel·lial mitjançant capilaroscòpia digital. Després d'efectuar les anàlisis bioquímiques i genètiques pertinents es busca correlació entre aquestes variables i la malaltia.

L'estudi no suposa cap risc que no sigui el derivat de l'extracció de sang.

El benefici de l'estudi és profunditzar en el coneixement de la malaltia per millorar la detecció, el diagnòstic i el tractament. A curt termini no es preveu que els resultats obtinguts de l'estudi puguin beneficiar al participant, sinó que en tot cas aquests resultats beneficiaran a tota la població.

Els responsables de l'estudi, i per tan de les mostres i les dades, són investigadors de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus, CAP Cambrils i CAP Reus V, que poden establir col·laboracions científiques amb altres institucions acadèmiques o empreses privades. En el cas de les empreses privades, aquestes poden obtenir beneficis econòmics derivats dels descobriments que es facin amb aquestes col·leccions. La col·laboració amb altres institucions pot suposar que es cedeixi part de la mostra, procediment que es farà tenint en compte les normes de confidencialitat i seguretat que li hem explicat.

L'equip investigador garanteix la confidencialitat respecte a la identitat del participant i per altra banda garanteix que la col·lecció i els resultats derivats de la investigació seran utilitzats per la finalitat descrita i no d'altra.

He estat informat de la naturalesa de l'estudi que es resumeix en aquesta fulla i la d'informació al participant, he pogut fer preguntes que aclareixen els meus dubtes i finalment he pres la decisió de participar, sabent que la decisió no afecta la meva atenció mèdica al centre i que em puc retirar de l'estudi en qualsevol moment.

	Nom i cognoms	Data	Signatura
Pacient			
Informant			

## METBANC. FULL D'INFORMACIÓ PEL PARTICIPANT

### Naturalesa del projecte

El projecte de recerca pel que li demanem la seva participació té per títol "**Estudi clínic i genètic pacients amb factors de risc cardiovascular majors: Hipertensió arterial, diabetis mellitus tipus 2, hiperlipèmia i síndrome metabòlica**". L'objectiu de l'estudi és identificar les bases genètiques i les seves relacions en les manifestacions clíniques. En l'estudi hi participaran pacients que presentin almenys alguna d'aquestes malalties. Es preveu que la fase de reclutament de participants en l'estudi tingui una durada de dos anys. L'anàlisi de les dades obtinguda i l'anàlisi genètica es pot estendre durant més anys. Els investigadors responsables d'aquest estudi pertanyen a l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus, CAP Cambrils i CAP Reus V.

### Disseny de l'estudi

Es tracta d'un estudi longitudinal . En total s'espera la participació d'unes 400 persones.

### En què consisteix la participació

1. Permetre que els investigadors puguin conèixer i emprar dades sociodemogràfiques (lloc de naixement, etc.) i clíniques (les derivades de les proves i de la història clínica en el cas dels pacients).
2. Realitzar una entrevista diagnòstica.
3. Permetre una extracció de sang en dejú.
4. Permetre la realització d'una ecografia d'artèries caròtides i femorals.

### Què fan els investigadors amb la mostra de sang

Les mostres de sang es processaran per tal de separar el plasma de les cèl·lules. El plasma es guarda congelat per fer, posteriorment, anàlisis bioquímiques. De les cèl·lules sanguínies se n'extreu el material genètic (l'ADN i l'ARN) amb el que es faran les anàlisis genètiques. En el cas de que l'ADN o l'ARN obtingut fos insuficient li demanaríem una nova extracció de sang o aplicaríem tècniques d'amplificació en el laboratori.

Part del plasma, de l'ADN i ARN de la seva mostra es dipositarà congelat en el banc de mostres del nostre centre per anàlisis futures amb el mateix objectiu. Aquest material podrà ser

compartit amb altres grups d'investigació tant de centres públics com d'empreses privades, procediment que sempre es farà sota les normes de seguretat i confidencialitat necessàries.

Cada vegada que els investigadors plantegin un nou projecte, aquest haurà de ser avaluat pel Comitè d'Ètica per tal que verifiqui que l'objectiu de l'estudi no és diferent del que vostè ha estat informat.

### **Què fan els investigadors amb les dades que recullen**

Les dades es guarden en fitxers en paper o informàtics. Aquests fitxers identifiquen a cada participant amb un codi, per tant no contenen ni el seu nom ni cap dada que pugui trencar els seu dret a la confidencialitat. Amb les dades d'aquests fitxers després es fan anàlisis estadístiques per relacionar-les amb els resultats de les anàlisis genètiques. Finalment els resultats derivats d'aquestes anàlisis es publiquen en revistes científiques.

Aquestes dades no s'empraran per cap altra finalitat que no sigui la descrita i per al seu ús se seguirà sempre: la seva voluntat, la normativa vigent respecte a protecció de dades de caràcter personal i en general a la ètica en la investigació científica.

### **Què fan els investigadors amb les imatges ecogràfiques**

Les imatges es guarden en fitxers informàtics. Aquests fitxers identifiquen a cada participant amb un codi, per tant no contenen ni el seu nom ni cap dada que pugui trencar els seu dret a la confidencialitat. Amb les dades d'aquests fitxers després es fan anàlisis estadístiques per relacionar-les amb els resultats de les anàlisis genètiques i dades clíniques. Finalment els resultats derivats d'aquestes anàlisis es publiquen en revistes científiques.

Aquestes dades no s'empraran per cap altra finalitat que no sigui la descrita i per al seu ús se seguirà sempre: la seva voluntat, la normativa vigent respecte a protecció de dades de caràcter personal i en general a la ètica en la investigació científica.

### **Beneficis i riscos de participar en l'estudi**

El benefici de l'estudi és aprofundir en el coneixement de les malalties per tal de millorar-ne la detecció, el diagnòstic i el tractament. A curt termini no es preveu que els resultats obtinguts de l'estudi puguin beneficiar directament a l'individu participant, sinó que seran uns resultats que beneficiaran a la població en general.



Aquest estudi pot ajudar a identificar trets de les malalties i gens que contribueixin a descobrir noves possibilitats diagnòstiques, nous tractaments o noves situacions d'interès comercial. En aquest cas, vostè com a participant no podrà reclamar compensacions econòmiques.

Els riscos pels participants de l'estudi són mínims o inexistents. Excepcionalment pot sorgir alguna complicació menor derivada de l'extracció de sang.

### **Garantia de participació voluntària**

Els investigadors li garantim que, sigui quina sigui la seva decisió respecte a la participació en el projecte, de cap manera es veurà afectada la seva atenció pel personal del centre. A més, en cas que vostè accepti participar, ha de saber que es pot retirar en qualsevol moment sense haver de donar explicacions, i en tal cas, la seva mostra serà retirada del banc.

### **Confidencialitat**

El centre i els investigadors es responsabilitzen que en tot moment es mantingui la confidencialitat respecte la identificació i les dades del participant. El nom i les dades que permeten identificar el pacient només consten a la història clínica. Totes les dades d'aquesta investigació, es guarden informatitzades en uns fitxers especialment dissenyats per a la investigació i ni el seu nom ni cap dada que el pugui identificar no hi apareixerà. Cada participant és identificat amb un codi per tal d'evitar emprar el seu nom, així aquest codi l'identifica en tot l'estudi (en les mostres, en les bases de dades, etc.). Els investigadors que no pertanyen a l'equip d'assistència, com per exemple els del laboratori reben identificades les mostres només amb el codi. Aquests procediments estan subjectes a la Llei Orgànica 15 /1999 del 13 de desembre sobre protecció de dades de caràcter personal i adscrits al Codi Tipus de protecció de dades de la Unió Catalana d'Hospitals.

### **Preguntes**

Ara li donem l'oportunitat que, si no ho ha fet abans, faci preguntes. Les hi respondrem de la millor manera.

